

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

## LA CELLULE GÉANTE *SYNCYTIUM* OU DÉRIVÉ DE *SYNCYTIUM* CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES GRANULOMES

par LIÉNAUX, professeur  
et HAMOIR, agrégé à l'École de médecine vétérinaire  
de Cureghem-lez-Bruxelles.

Les recherches que nous exposerons ici ont eu pour point de départ des études sur les altérations du rachitisme, de l'ostéomalacie et de l'ostéoporose (1). Constatant que l'hypohaversogenèse engendre l'haversomégalie, et qu'inversement le fort volume des os n'est obtenu qu'aux dépens de leur densité, par suite de l'adéquation des facultés ostéogènes et des surfaces à couvrir d'osséine, nous nous étions demandé si la relation des surfaces et des volumes, considérée dans les cellules géantes et dans les cellules ordinaires, ne pourrait pas expliquer l'énigme qui pèse toujours sur la valeur anatomique et sur la valeur fonctionnelle des premières. L'anatomie pathologique comparée nous a fourni de précieuses indications à cet égard.

Disons de suite que nous avons visé tout d'abord les cellules géantes dont l'existence est liée à celle des processus inflammatoires chroniques et que Laulanié (2) avait qualifiées cellules

(1) *Bull. de l'Acad. royale de Médecine de Belgique*, 1919.

(2) *Etude critique et expérimentale sur les cellules géantes*, 1888.

géantes irritatives. Il nous avait paru en effet que les cellules géantes tumorales pouvaient n'être, comme les tumeurs elles-mêmes auxquelles elles appartiennent, que des anomalies de développement sans finalité dont il serait par conséquent prématuré d'étudier les conditions d'adaptation. Nous avons pourtant été amenés plus tard à les comparer aux cellules irritatives et cette confrontation nous a conduits à l'élargissement du groupe de celles-ci, en même temps qu'au rétrécissement de celui des tumeurs sarcomateuses; ce point sera envisagé dans un travail ultérieur.

C'est dans le tubercule que la cellule géante irritative ou cellule de Langhans est le plus souvent rencontrée. Les auteurs la représentent comme formant le centre de cette lésion considérée à son stade initial; elle y est entourée de cellules polyédriques, dites épithélioïdes, formant un nombre variable d'assises et elles-mêmes bordées extérieurement de lymphocytes entremêlés aux éléments conjonctifs et autres de l'organe envahi.

Mais le tubercule n'est qu'une formation anatomique particulière que l'on observe au cours de maladies diverses relevant de causes microbiennes (bacilliose ou tuberculose, morve, actinomycose, actinobacilliose, lèpre, etc.) ou de causes parasitaires (aspergillose, strongylose vasculaire, gale démodectique, syphilis, etc.). L'édification tuberculeuse paraît dirigée dans chacune de ces maladies contre l'agent causal et avoir pour but, sinon toujours pour effet, d'enrayer son action, de nuire à son développement ou de provoquer sa destruction dans les limites étroites du nodule inflammatoire. Ses modalités sont diverses. Dans la tuberculose, par exemple, le champ de la défense organique se trouve d'habitude peu à peu reculé circulairement devant le front d'attaque du bacille, parce que les premières lignes cellulaires de la résistance succombent successivement (caséification); mais cette mortification centrale peut manquer dans la tuberculose et elle fait constamment défaut dans d'autres affections, dans l'actinomycose notamment. Dans la morve pulmonaire, la lésion ne prend l'aspect histologique du tubercule que secondairement, autour du foyer mortifié de pneumonie militaire qui évolue primitivement dans chacun des points où une embolie spécifique s'est fixée. Il s'agit là de phé-



nomènes contingents, inhérents à la nature particulière des facteurs pathogènes et des résistances en présence. De simples corps aseptiques peuvent provoquer des néoformations tuberculiformes et celles-ci apparaissent par conséquent comme un moyen de défense très général contre des causes d'irritation localisées et d'effet durable. La cellule géante fait généralement partie des éléments qui y figurent et elle a son rôle à jouer dans l'œuvre de défense de l'économie. L'anatomie pathologique l'a surabondamment prouvé en montrant les rapports que cette cellule

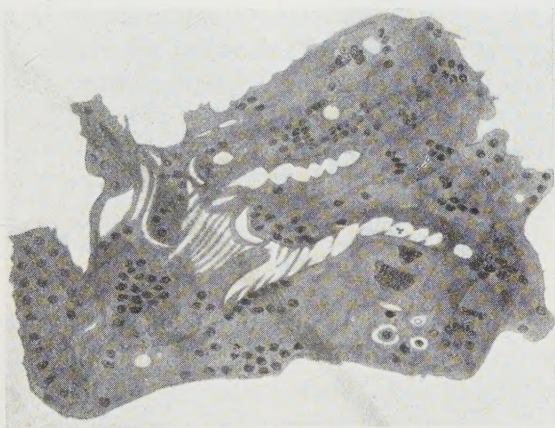


FIG. 1. — Symplaste en fragmentation dans un tubercule du foie du paon, pouvant donner l'illusion d'une énorme cellule géante, mais qui en comprend, en réalité, plusieurs.

contracte avec les microbes, avec les parasites ou avec les corps étrangers; au surplus, l'accord est unanime pour la considérer comme un phagocyte fixe.

Nous ne nous attarderons pas à refaire la description des cellules géantes; on la trouvera dans les ouvrages classiques et dans nombre de travaux spéciaux; il n'y a rien été ajouté depuis nombre d'années. Nous rappellerons seulement leurs dimensions relativement grandes, quoique fort variables, et la multiplicité habituelle de leurs noyaux, ceux-ci pouvant dépasser la centaine. Celles des oiseaux sont remarquables par l'importance de leurs diamètres; mais une remarque doit être faite et le lecteur saisira mieux son importance au cours des

développements qui suivront. Les altérations tuberculeuses des oiseaux donnent, sous le microscope, plus souvent que celles des mammifères, des aspects symplastiques que l'on peut, à la rigueur, considérer comme appartenant à des cellules géantes, mais qui ne sont en réalité que la matrice d'où ces dernières dérivent. C'est ainsi que nous avons mesuré  $315\ \mu$  en longueur et  $215\ \mu$  en largeur pour un élément qui renfermait plus de deux cents noyaux; or il s'agissait d'un syncytium coupé tangentiellement dans la paroi d'un tubercule caséeux et dont plusieurs lignes de fragmentation étaient déjà bien visibles (fig. 1). La forme des cellules de Langhans est vraiment quelconque. Les prolongements dont elles sont ordinairement pourvues et qu'on a expliqués par la configuration étoilée de certains des éléments qu'elles peuvent s'être adjoints à leur périphérie trouveront une interprétation complémentaire dans un processus formatif qui n'a pas été signalé jusqu'ici.

### Tuberculose aviaire.

Il était naturel que nous commencions nos recherches sur du matériel provenant d'oiseaux tuberculeux, les lésions de la tuberculose aviaire étant particulièrement riches en cellules géantes. Nous débiterons donc par l'exposé des observations que nous avons faites sur la poule, le faisan et le paon.

Les lésions ont été fixées diversement, soit au formol à 10 p. 100, soit au mélange picro-formol de Bouin, soit encore au mélange bichromate potassique-acide acétique de Tellyes-niczky. Nous avons varié les colorations sans sortir des techniques qui sont d'usage courant en histologie.

Un fait essentiel nous a frappés dès nos premières recherches. Alors que dans certains tubercules jeunes, les cellules épithélioïdes sont parfaitement distinctes les unes des autres dans toute l'étendue de la coupe, dans beaucoup d'autres, il est impossible de reconnaître les limites propres de ces éléments dont la plupart sont soudés de manière à former une masse commune, véritable syncytium ou symplaste; les noyaux cellulaires qui occupent le protoplasme de ce dernier y sont uniformément répartis comme ils le sont dans les sections formées de cellules épithélioïdes (fig. 2, 1), ou bien on les trouve distribués



par groupes de deux, de trois ou d'un plus grand nombre d'unités (fig. 2, 2). Cette concentration des noyaux en de multiples endroits du symplaste fournit des aspects qui rappellent déjà ceux des cellules géantes ; elle marque comme une ébauche de celles-ci.

Le symplaste occupe la plus grande partie de la coupe du

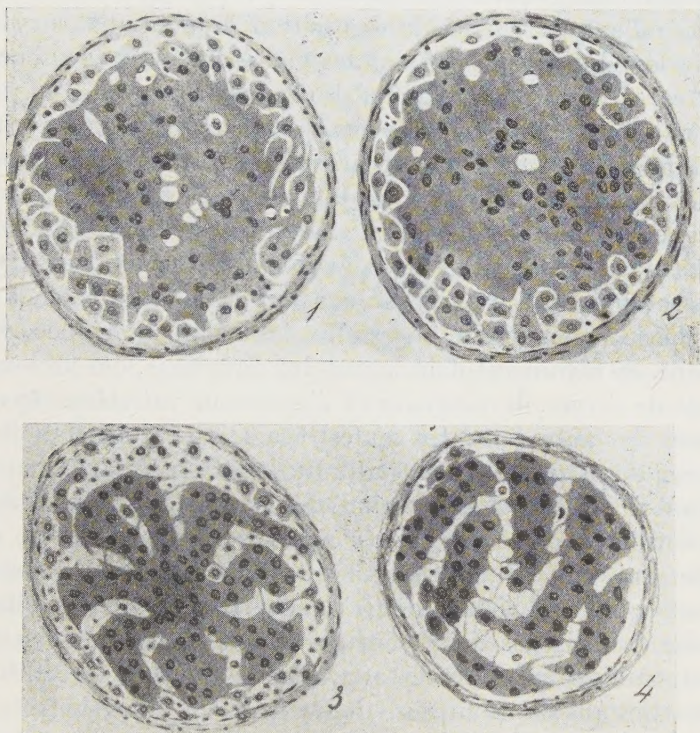


FIG. 2. — Tubercules récents de la poule. En 1, syncytium avec noyaux encore assez régulièrement distribués. En 2, leur concentration est mieux marquée. En 3, on voit le symplaste rayonnant autour du centre. En 4, la coupe figurée passe en dehors du centre du tubercule.

tubercule ou seulement une étendue plus restreinte. Sa configuration est sujette à varier beaucoup, même pour une lésion déterminée, d'un point à un autre de l'épaisseur de celle-ci. Plusieurs syncytiums peuvent exister dans une même section ; ils sont alors séparés par des cellules épithélioïdes encore individualisées ou par les espaces vides dont il sera parlé plus loin

(fig. 2, 4). A côté des noyaux vésiculeux des cellules épithélioïdes dont il est formé, le symblaste renferme souvent des noyaux de leucocytes ou même des globules blancs entiers bien distincts.

Il n'est pas rare d'y voir, comme dans les cellules géantes, des vacuoles arrondies ; la coloration au Soudan de préparations non traitées par les dissolvants des corps gras montre que ces vacuoles résultent de la disparition de gouttelettes grasses lors du passage au xylol des pièces à débiter en coupes ; elles caractérisent donc un état de dégénérescence.

Seul l'examen de coupes sériées des tubercules jeunes permet d'attribuer toute leur signification aux particularités précédentes. On reconnaît ainsi que le syncytium occupe le centre du tubercule ; qu'il y forme une masse non toujours régulière, bordée de cellules épithélioïdes en couches plus ou moins nombreuses ; que cette masse est souvent déjà fragmentée à sa périphérie de manière à prendre la forme d'un bloc d'où partent, en rayonnant dans toutes les directions, des prolongements de forme, de longueur et d'épaisseur variables, séparés les uns des autres par des fentes (fig. 2, 3). On constate dans ce cas que ces solutions de continuité, tout en étant découpées suivant des lignes dépourvues d'uniformité, laissent voir dans ces dernières des droites, des courbes, des dentelures, des angles qui, rapprochés bord à bord, se coaptent parfaitement, de sorte qu'il faut bien admettre que la fissuration du symplaste résulte des brisures qui y sont survenues. Il n'y a pas seulement eu division du syncytium, mais rétraction de celles de ses parties qui sont comprises entre deux fentes voisines.

Cette dernière interprétation est confirmée par l'existence de travées protoplasmiques tendues à travers les fentes, d'un bord à l'autre de celles-ci, et qui délimitent à l'occasion des aréoles où l'on rencontre de-ci, de-là, une cellule épithélioïde, un leucocyte ou seulement les noyaux de pareils éléments. Quand ces travées ont été rompues par le retrait des fragments symplastiques entre lesquels elles étaient tendues, il en peut demeurer des traces en bordure sous l'aspect de pointes ou d'éperons. Le mouvement de rétraction se produit d'habitude aussi de la périphérie vers le centre et la preuve en est dans les vides, dans les trabécules et les éperons que l'on retrouve



du côté excentrique des symplastes rayonnants, les reliquats de l'adhérence se portant aux cellules épithélioïdes voisines ou persistant sur ces cellules au même titre que sur le syncytium lui-même. Les blocs périphériques ainsi délimités dans le syncytium du tubercule jeune sont les représentants des futures cellules géantes. Aucun doute n'est plus permis à ce sujet, lorsque les noyaux qui y sont enfermés se sont déjà rapprochés les uns des autres; il faut noter d'ailleurs que la concentration nucléaire et le cloisonnement syncytial ne paraissent pas devoir être nécessairement contemporains.

Un détail qui a son importance doit être rapporté ici. Lorsqu'on traite les coupes de manière à colorer les bacilles de la tuberculose, on constate que la répartition de ces derniers est précisément la même que celle du syncytium. Certes, on peut rencontrer des bacilles dans les cellules épithélioïdes demeurées libres, mais ils sont toujours notablement plus abondants dans les formations symplastiques qui paraissent ainsi avoir un rôle spécial à remplir dans la défense des tissus contre les microbes.

Considérons maintenant le cas des tubercules déjà caséifiés et examinons tout d'abord l'image fournie par des sections équatoriales. Sans nous attarder à l'aspect lui-même variable du caséum, nous dirons qu'à un premier stade, le tissu tuberculeux qui l'entoure immédiatement peut encore présenter la configuration syncytiale dans la majeure partie de son étendue. La nappe protoplasmique qui le constitue est remarquable par la disposition de ses noyaux qui se rangent à côté les uns des autres, par endroits assez régulièrement espacés, de manière à dessiner, soit des séries curvilignes à convexité externe, soit des groupements désordonnés, mais toujours situés à distance du foyer caséeux. On ne comprend cette disposition que par un déplacement centrifuge des noyaux et nous avons le devoir de rappeler que Chaussé (1) avait déjà attribué la concentration des noyaux, organes essentiels de la vie cellulaire, dans les cellules géantes du bœuf, à leur migration qui les éloigne des bacilles et leur permet de mieux résister à ceux-ci.

En outre de ce détail relatif aux noyaux vésiculeux, le sym-

(1) La tuberculose intestinale du bœuf. Ces *Annales*, 1920.

plaste des tubercules caséux présente ceux que nous avons déjà indiqués à propos des nodules plus jeunes, c'est-à-dire qu'il contient plus ou moins de leucocytes et de vacuoles et qu'il montre, de-ci, de-là, des fissures dont la direction générale est radiaire, dont les dimensions sont très inégales, qui sont ou non cloisonnées par des bandes protoplasmiques ou pourvues de becs ou éperons latéraux. La plupart de ces solutions de continuité alternent avec les groupes nucléaires; elles sont entièrement incluses dans le syncytium, ou bien elles s'ouvrent à sa base, du côté de la circonférence du granulome. Le plus souvent vides, elles peuvent loger une ou des cellules épithélioïdes, un ou des leucocytes ou seulement leurs noyaux (fig. 3).

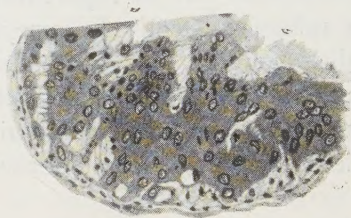


FIG. 3. — Partie de la paroi d'un tubercule caséux de la poule; on y voit une masse symplastique déjà fissurée et se continuant en haut avec le caséum.

A une période plus avancée, les fentes se sont complétées de manière à s'ouvrir à la base du protoplasme commun et à diviser ce dernier en une série de blocs polyédriques qui ne permettent pas d'hésiter sur leur véritable nature (fig. 4). Ces blocs représentent chacun une cellule géante dont les noyaux occupent surtout le fond et les parois latérales, tandis que l'extrémité centrale se prolonge jusqu'au contact du caséum et demeure d'habitude en continuité avec les cellules géantes voisines. Au moment d'aborder la substance mortifiée, ces éléments giganto-cellulaires s'altèrent profondément; leur protoplasme se creuse d'un grand nombre de vacuoles qui marquent le départ de gouttelettes graisseuses et prend de ce fait un aspect spongieux très spécial. L'ensemble des cellules géantes considérées à ce niveau forme une bande qui entoure immédiatement le centre caséux et qui tranche par sa teinte pâle et par son état de division. Cette zone, et aussi les portions les plus



proches, encore vivantes des cellules géantes, laissent voir de rares noyaux, les uns encore bien conservés et prenant normalement les réactifs colorants, les autres déformés et pouvant avoir perdu leurs affinités tinctoriales. A ce dernier point de vue, les phénomènes se passent diversement, certaines lésions caséifiées se laissant teindre intensément par les colorants de la nucléine, alors que d'autres ne les prennent plus. Les noyaux eux-mêmes sont altérés à des degrés très différents, leur configuration pouvant être à peine changée, tandis que leur substance est, d'autres fois, réduite à l'état de grains épars.

Lorsqu'il est possible de les reconnaître dans le caséum, ils y apparaissent infiniment plus nombreux que dans la bande



FIG. 4. — Partie de la paroi d'un tubercule caséeux de la poule. La fragmentation du syncytium est très avancée; les cellules géantes sont bien visibles.

marginale dont il vient d'être question, ce qui revient à dire que cette dernière, en s'incorporant à la masse nécrosée du tubercule, y subit un phénomène de condensation.

Considéré à sa bordure externe, le syncytium est au contact de cellules épithélioïdes; mais celles-ci peuvent manquer et il est alors contigu aux cellules conjonctives banales et aux lymphocytes qui s'y mêlent ordinairement à la périphérie du tubercule. Lorsque les cellules géantes se sont délimitées, ce sont elles qui contractent individuellement ces rapports, lesquels ne sont pas uniquement de simple contiguité. Il est, en effet, très courant de voir des cellules épithélioïdes se continuer, soit avec le symplaste, soit avec la base des cellules géantes; leur soudure est large ou représentée seulement par des tractus protoplasmiques déliés comme ceux dont nous avons indiqué l'existence dans les fentes du syncytium et entre les cellules géantes. Chaussé avait noté chez le bœuf ces anastomoses des

cellules géantes avec les cellules épithélioïdes et la trame du tissu ; elles marquent, selon lui, l'ébauche des phénomènes de coalescence qui aboutissent à la formation des éléments giganto-cellulaires. Le même auteur avait bien vu aussi les liens de continuité qui existent entre les cellules géantes et le caséum dans la partie des premières qui se trouve à l'opposé de celle où les noyaux se sont réfugiés. Dans les tubercules des oiseaux (fig. 5 et 6) le centre caséux apparaît comme le produit accumulé de la nécrose incessante du bout central des cellules géantes. Les

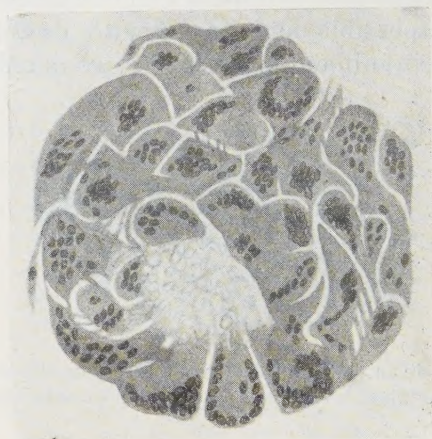


FIG. 5. — Tuberculose péritonéale de la poule. La coupe est oblique et passe en dehors du centre ; en haut, les cellules géantes sont coupées en travers, suivant des incidences diverses ; en bas, elles sont coupées radialement et on les voit plongeant dans le caséum par leur extrémité centrale.

images sont différentes lorsque, au lieu de traverser le nodule caséux en passant par le centre, le rasoir passe en dehors de ce dernier. Dans ce cas, le symplaste non encore disloqué se montrera avec les apparences qu'il avait dans le tubercule gris, ou bien, s'il a subi déjà la fragmentation signalée plus haut, les cellules géantes qui en sont issues auront été coupées transversalement, sous des incidences un peu différentes suivant les points considérés, et elles seront circulaires, ovalaires ou anguleuses (fig. 5). Leurs noyaux seront disposés en couronne périphérique ou en couronne centrale ; elles posséderont à l'occasion deux cercles concentriques de noyaux ou encore un ou plusieurs groupes plus ou moins compacts de ces derniers. Il pourra se



faire encore que la cellule qui se présente ainsi ne renferme qu'un seul ou quelques noyaux et même qu'elle en soit dépourvue. Toutes ces variantes dépendent du point de la longueur de la cellule géante où le rasoir a enlevé la tranche examinée ; nous savons que les noyaux se réfugient à distance du centre caséeux. Dans les mêmes préparations, les cellules géantes présentent des prolongements par lesquels elles s'anastomosent entre elles ou sont hérissées de pointes, de becs, d'éperons qui témoignent des rétractions subies par le symplaste fragmenté.

Le mécanisme de la formation des cellules géantes des oiseaux

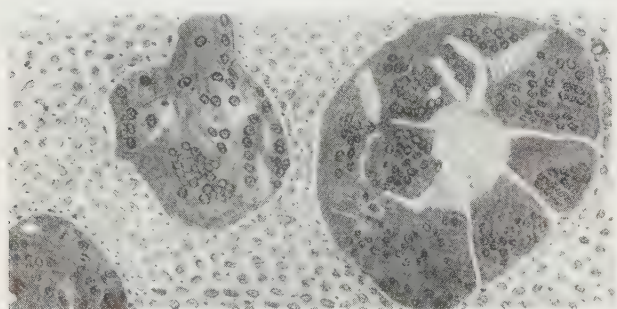


FIG. 6. — Tuberculose du foie d'un paon. A gauche, tubercule jeune montrant un symplaste avec noyaux groupés ; à droite, tubercule caséeux avec cellules géantes dont la plupart sont coupées radialement.

nous apparaît donc très clairement. Il comporte les temps suivants : 1° fusion des cellules épithélioïdes en syncytium ; 2° fragmentation de ce dernier en blocs polyédriques ou cylindriques suivant des plans en général radiaires par rapport au centre du nodule, de telle façon que les cellules géantes demeurent continues entre elles par leur extrémité interne ; 3° rétraction du protoplasme de chacune de ces parties qui s'isole plus ou moins des blocs voisins.

Le sort des noyaux des cellules géantes nous les montre se groupant à distance du centre du nodule tuberculeux, pendant le même temps où la cellule meurt et tombe à l'état caséeux par son bout central. Furent-ils le contact des toxines bacillaires élaborées plus abondamment vers le centre ; sont-ils attirés par l'appât des sucs nutritifs qui filtrent dans les fissures du sym-

plaste et qui continuent à arriver du côté de sa base? Chimiotaxie négative dans la première hypothèse, chimiotaxie positive pour la deuxième; ni l'une ni l'autre n'est déplacée. Quoi qu'il en soit, il y a lieu de faire l'étude des cellules de Langhans chez les mammifères pour voir à quel point les données recueillies chez les oiseaux pourraient leur être applicables.

### Tuberculose des mammifères.

Ses altérations sont souvent plus complexes que celles des oiseaux en ce sens que les tubercules des mammifères s'entourent d'habitude de tubercules secondaires sur lesquels il s'en greffe d'autres, de telle sorte qu'il en résulte des conglomerats tuberculeux. Au sein de ceux-ci, il peut être malaisé, qu'ils soient demeurés crus ou qu'ils aient été envahis par la caséification, de reconnaître le territoire et les éléments propres de chaque lésion élémentaire. Nous avons étudié semblables conglomerats chez le bœuf, dans les poumons, la plèvre, les vertèbres, les méninges; chez le cheval, dans la rate et les ganglions abdominaux; chez l'homme, dans le foie, la rate et les poumons. Disons en passant que la formation de ces conglomerats, qui est propre aux mammifères, ne paraît possible que parce que ces animaux résistent plus longtemps à la tuberculose qu'il leur est propre que les oiseaux ne survivent eux-mêmes à la tuberculose aviaire.

Voyons d'abord ce que peut nous apprendre l'examen des tubercules élémentaires. Les trois aspects reproduits dans la figure 7 en sont une illustration.

Le premier (fig. 7, 1) montre, au centre d'un tubercule jeune, une couronne de noyaux rassemblés à une certaine distance de ceux du symplaste extérieur. La cellule géante est nettement indiquée, mais sa limite externe ne l'est pas encore. Il est à prévoir que la fissuration se fera en dehors de la zone circulaire des noyaux; il n'en existe pour le moment aucune trace. La future cellule géante fait donc encore partie du syncytium diffus, lequel s'étend plus ou moins vers la périphérie du tubercule.

Dans la même figure, en 2, la cellule géante est circonscrite par une sorte de sillon disjoncteur et celui-ci est traversé, en de



multiples endroits, par des ponts protoplasmiques qui maintiennent l'unité du symplaste en travail de segmentation. Pareil sillon ne peut guère se comprendre que par le retrait du protoplasme qui est en train de s'isoler de la masse commune.

Le dessin reproduit en 3 se rapporte à un stade plus avancé de l'évolution du tubercule. Il s'agit d'une lésion élémentaire

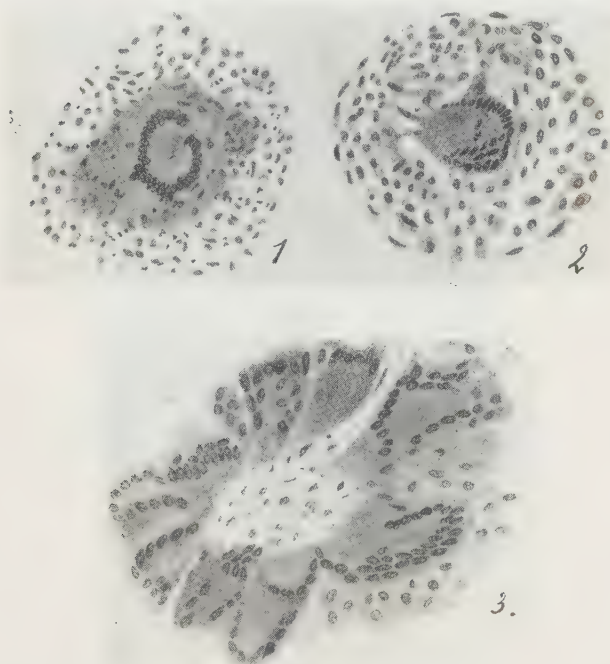


FIG. 7. — Tuberculose humaine; 1 et 2, tubercules gris; 3, tubercule caséux de la rate.

dont le centre a commencé de subir la caséification. On distingue autour de ce centre quelques cellules géantes bien reconnaissables, déjà isolées de leurs voisins; dans les autres points, on remarque seulement des groupes de noyaux espacés les uns des autres au sein du symplaste; des fissures radiaires y sont déjà visibles et l'ensemble de la préparation fait prévoir comment, à l'intervention d'autres éclatements semblables du protoplasme, l'organisme achèvera de réaliser l'encerclement du caséum par des cellules géantes. Nous retrouvons donc ici

la même disposition que nous avons vue chez les oiseaux. Les cellules de Langhans y prennent l'aspect d'éléments cylindriques ou polyédriques souvent anastomosés entre eux par leurs faces latérales et pourvus à leur base de prolongements qui s'enfoncent dans le syncytium ou se portent à la rencontre des cellules épithélioïdes. Comme elles sont orientées de la périphérie

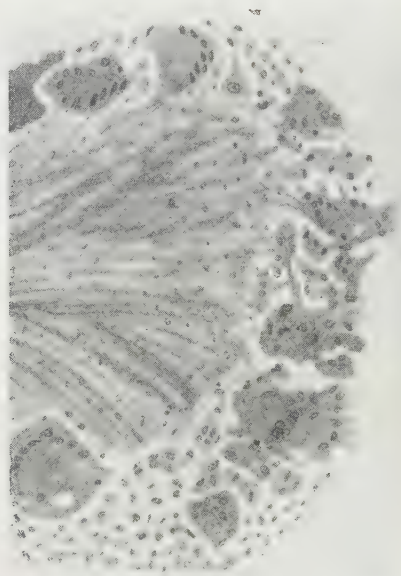


FIG. 8. — Couronne de cellules géantes autour d'un foyer caséux dans un conglomérat tuberculeux du bœuf.

du tubercule vers le caséum central, elles se présenteront autrement dans les sections du tubercule qui ne traverseraient pas le foyer mortifié ; coupées transversalement ou obliquement, elles seront ou circulaires ou polygonales, leurs noyaux seront aussi diversement collectés, ainsi que nous l'avons déjà indiqué à propos de la tuberculose aviaire.

La même orientation par rapport au caséum subsiste pour les cellules géantes des conglomérats tuberculeux. L'incidence heureuse du rasoir permettra de les voir plongeant par la tête dans la zone mortifiée (fig. 8 et 9), mais un détail nouveau se présente en ce sens que les cellules géantes sont le plus souvent séparées les unes des autres par du tissu de granulation, autre-



ment dit par des cellules épithélioïdes en quantité d'importance variée, mais toujours notable. Comme les cellules de Langhans peuvent être traversées diversement par le rasoir, elles pourront paraître sans contact avec le caséum et même totalement entourées de tissu épithélioïde.

Les coupes faites dans les mêmes conglomérats en dehors des points caséux vont nous fournir des documents nouveaux pour l'interprétation de la genèse des cellules géantes.

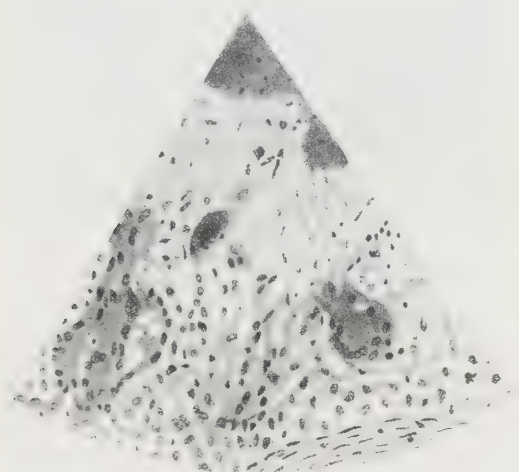


FIG. 9. — Autre aspect du tissu tuberculeux autour du caséum dans un conglomérat tuberculeux du bœuf.

Au sein du tissu de granulation dont ces coupes sont formées on rencontre des nappes parfois fort étendues de syncytium.

Nous en avons rencontré qui dépassaient le champ du microscope. Leurs noyaux vésiculeux, qui ne diffèrent pas de ceux des cellules épithélioïdes, sont encore régulièrement répartis ou sont déjà rassemblés par endroits de manière à figurer ici des cercles, là des ovales, ailleurs encore des arcs isolés, parfois successifs et concentriques, ou des groupes de forme quelconque (fig. 10). Entremêlés à ces noyaux, il se trouve, suivant les cas, plus ou moins de noyaux leucocytaires et de vacuoles dont la graisse a disparu par l'action des milieux dissolvants; des cellules épithélioïdes et des leucocytes facilement reconnaissables peuvent également exister au sein des sym-

plastiques. On y voit encore, mais c'est un détail inconstant, des solutions de continuité d'ordinaire rigides, droites, courbes ou anguleuses qui parfois se divisent ou se croisent de manière à

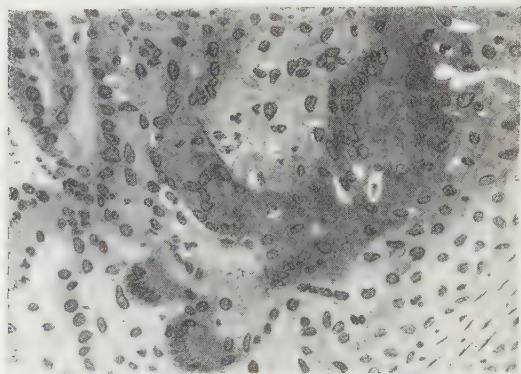


FIG. 10. — Tuberculose pleurale du bœuf. Nappes symplastiques et collections nucléaires.

délimiter des blocs polygonaux de configuration très variée dont les noyaux sont ou non déjà orientés comme nous venons de l'indiquer (fig. 11 et 12). Ces blocs représentent de futures cellules géantes. Entre eux et celles de ces dernières qui ont acquis leurs caractères classiques, on retrouvera des formes intermédiaires qui témoignent d'une évidente filiation : mais il

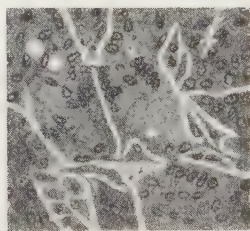


FIG. 11. — Tuberculose humaine. Syncytium en voie de division dans une coupe tangentielle en dehors du caséum.

va de soi qu'on ne les saisira qu'en multipliant les examens, les cellules géantes achevées ne pouvant exister dans les mêmes points où on les voit débiter.

Vues dans les conglomerats, les cellules typiques de Lang-



hans sont encore généralement disposées par groupes comme les blocs précédents. Cela se conçoit; ces derniers sont rarement totalement discontinus; des bandes, des filaments de

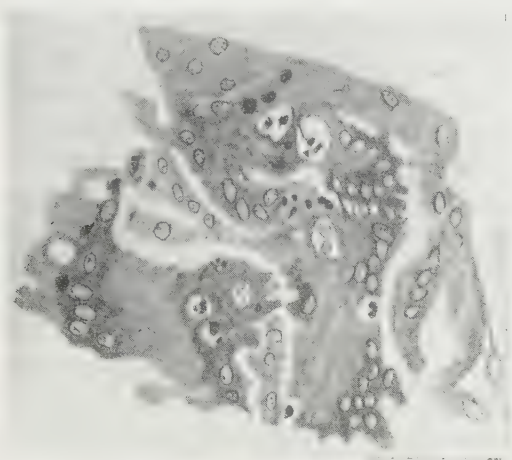


FIG. 12. — Tuberculose vertébrale du bœuf. Syncytium en voie de division; coupe de même direction et situation que ci-dessus.

protoplasme continuent à les unir et deviennent plus tendus à mesure que les distances augmentent. Les choses se passent comme si des foyers de condensation, de contraction apparaissaient au sein du symplaste diffus, et comme si chacun de ces

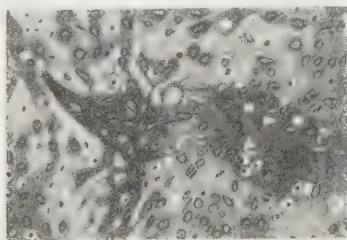


FIG. 13. — Tuberculose pleurale du bœuf. Deux cellules géantes qui s'écartent et dont les filaments d'union s'étirent.

centres attirait à lui un certain territoire de la substance protoplasmique qui l'entoure, de manière à la décoller des territoires contigus que de simples cassures séparent tout d'abord. Puis, le mouvement de retrait continuant ses effets, chacun de

ces territoires s'éloigne peu à peu de ses congénères, ou, éventuellement, des cellules épithélioïdes. Si certaines des travées d'union qui ont subsisté conservent leurs rapports avec les cellules dont elles proviennent (fig. 13), d'autres s'étirent au point de se déchirer et ce qui en reste apparaît dorénavant comme des prolongements des cellules géantes maintenant typiques ou sous celui de becs, de pointes, d'éperons dont la direction atteste que les éléments qu'ils hérissent étaient autrefois continus avec d'autres qui sont à proximité, au même titre que les anastomoses qui les précédaient marquaient l'unité primitive du syncytium formateur. Les espaces qui s'ouvrent ainsi entre les cellules géantes en voie de s'individualiser sont d'abord pauvres en éléments cellulaires, mais ils ne tardent pas à être envahis par du tissu de granulation.

Parmi les cellules géantes, il en est de rondes, ou plus exactement de sphériques, ou sensiblement telles, qui, comme les autres, sont ou non munies de prolongements. Nous avons tendance à les tenir pour arrivées à une forme normale. On peut les rencontrer à côté de formes moins régulières. Il nous semble toutefois qu'elles sont plus nombreuses dans certaines altérations, comme si des facteurs particuliers, liés par exemple à l'âge ou à la bénignité de la maladie, peut-être à la résistance de l'individu, ou même de l'organe, étaient capables de hâter l'évolution vers ce stade. Nous avons notamment étudié une tuberculose méningée du bœuf dans laquelle les formes rondes étaient dominantes; les vaisseaux y avaient aussi un développement tout spécialement important, exceptionnel pour une lésion tuberculeuse.

Au sujet des noyaux de cellules géantes des mammifères, nous n'aurions rien à dire, s'il ne nous avait paru qu'ils sont plus souvent répartis en couronne et en couronne relativement régulière dans les formes rondes.

Les données précédentes nous ont donc fait voir que les cellules géantes des mammifères dérivent, comme celles des oiseaux, de la fragmentation du syncytium en blocs disposés comme les rayons d'une sphère autour du centre du tubercule. Les cassures rigides que nous avons décrites au sein du symplaste marquent le début de cette division; on ne peut les observer avec leur aspect de fentes croisées, ainsi que les blocs



polygonaux qu'elles délimitent, que pour autant que l'incidence du rasoir lui ait fait traverser transversalement ou obliquement les segments radiaires. Ces fissures appartiennent au symplaste en voie de division. Les cellules géantes encore réunies entre elles par des prolongements ou dont les prolongements leur sont devenus propres sont d'un âge plus avancé.

Il nous faut revenir un instant sur un détail que nous n'avions pas rencontré chez les oiseaux. Alors que nous avons constaté que les cellules géantes de ces derniers se côtoient étroitement autour du caséum, nous venons de voir que celles des conglomerats tuberculeux des mammifères se trouvent souvent écartées les unes des autres et que les espaces qui les séparent peuvent être comblés de cellules épithélioïdes et, éventuellement, de symplaste. Cette particularité différentielle ne nous est apparue dans toute sa netteté que dans les conglomerats, c'est-à-dire dans des altérations qui impliquent une survie assez longue. Dans ces conditions, le mouvement de retrait protoplasmique qui donne naissance aux cellules géantes continuant plus longtemps ses effets, lesdites cellules en arrivent à s'écarter davantage les unes des autres; les espaces qu'elles abandonnent se combleront de lymphes (on peut, en effet, y trouver fort peu d'éléments cellulaires), puis de leucocytes et de cellules épithélioïdes que leur fusion occasionnelle pourra transformer en syncytium. Ce caractère anatomique apparaît ainsi comme l'indice d'une certaine résistance de l'organisme. Quoi qu'il en soit, le retrait du symplaste et des cellules géantes ouvre des espaces à l'édification de nouvelles quantités de tissu de granulation. Dès le début de ce mouvement, alors qu'il n'existe que des fissures au sein du syncytium, la lymphe s'y porte inévitablement et il peut y avoir là un motif plausible à l'émigration des noyaux des cellules géantes vers les parties de ces éléments où la nutrition se trouve mieux assurée.

Réalité de l'existence des syncytiums dans les granulomes.

#### CELLULES GÉANTES DES GRANULOMES NON TUBERCULEUX.

Nous nous sommes abstenus de rappeler les descriptions classiques pour faire connaître surtout l'existence des sym-

plastés tuberculeux et le processus par lequel les cellules géantes en proviennent. Nous reviendrons pourtant sur quelques données acquises.

On a parlé de plasmodés, de cellules plasmodiales, à propos de cellules épithélioïdes plus grosses que les autres, contenant deux, trois ou un plus grand nombre de noyaux, que tous les auteurs mentionnent en faisant l'histoire du tubercule. Le terme syncytium ou symplaste conviendrait plutôt; ces prétendus plasmodés sont des symplastés de petites dimensions, un acheminement vers les formations de même ordre plus importantes, jusqu'ici méconnues.

La formation des symplastés a d'ailleurs été notée déjà dans l'évolution tuberculeuse. Borrel (1), entre autres, n'a-t-il pas vu, dès le troisième jour de l'injection intraveineuse de bacilles chez le lapin, de grandes cellules à noyau unique, qu'il identifie avec les grands leucocytes mononucléaires, se grouper autour des amas bacillaires, se souder entre elles et former des cellules géantes typiques, pouvant renfermer jusque 60 noyaux. D'autre part le travail de Broden (2) sur l'histogénèse du tubercule comporte une série de figures (n<sup>os</sup> 11 à 14 de la planche IV) où l'on peut voir de beaux symplastés résultant de la fusion de cellules fixes de l'épiploon du lapin.

Chaussé (3), après avoir montré l'épaississement des cloisons interalvéolaires du poumon par néoformation de cellules fusiformes, montre ces éléments fusiformes et les mononucléaires s'accolant, se tassant, et se fusionnant pour donner des cellules géantes. Il ajoute : « Il ne paraît y avoir aucune sélection dans le groupe des cellules qui donnent naissance à ce plasmode ; 10, 20 éléments voisins, quels qu'ils soient, deviennent coalescents et reportent leurs noyaux à la périphérie, enfermant dans leur protoplasme un ou plusieurs bacilles. C'est au contact des bacilles, peu nombreux encore, que la fusion des éléments épithélioïdes se produit ; le résultat, et sans doute le but de cette fusion, sont l'englobement et l'immobilisation des bacilles. »

(1) Ces *Annales*, 1888, p. 245.

(2) *Arch. de méd. expér. et d'anat. patholog.*, 1899.

(3) Etude des lésions tuberculeuses pulmonaires récentes. *Arch. de méd. expér. et d'anat. pathol.*, octobre, novembre 1915.



L'existence de formations syncytiales a été observée dans des altérations non tuberculeuses. Besnoit et Robin (1), à propos d'une pseudo-tuberculose de la peau des bovins, due à un parasite de la classe des protozoaires, s'expriment comme suit : « Dans les couronnes de leucocytes allongés perpendiculairement à la surface du parasite, on trouve fréquemment des cellules plurinucléées dont les noyaux sont disposés en rangées linéaires sur le bord excentrique de la cellule, dans l'alignement des noyaux périphériques des leucocytes voisins. De toute évidence, il y a eu simple accollement de plusieurs mononucléaires contigus par leurs faces adjacentes et fusion des protoplasmes en un bloc homogène. En certains points, la coalescence est encore incomplète et on peut deviner une ligne de démarcation entre deux cellules en voie de fusionnement. Cette agglomération des éléments leucocytaires semble avoir pour but l'englobement et la destruction de l'énorme proie constituée par le parasite. »

On a d'ailleurs discuté longtemps le point de savoir si les cellules géantes résultent de la soudure, pour les uns des cellules fixes des tissus de soutien, pour les autres des leucocytes macrophages, ou, au contraire, de la multiplication isolée des noyaux des mêmes éléments ayant pris les apparences des cellules épithélioïdes et dont le protoplasme grandirait au lieu de se diviser.

L'accord semble s'être fait aujourd'hui pour admettre que les cellules géantes dériveraient de la fusion des macrophages, gros éléments à protoplasme abondant et à noyau vésiculeux, identifiables ou très ressemblants aux grands leucocytes mononucléaires, qui prennent naissance dans les organes lymphatiques, peut-être aussi, en cas de processus infectieux localisés, aux dépens des endothéliums des capillaires lymphatiques.

Bordet (2) dit qu'ils jouissent de la remarquable propriété de se réunir par la fusion de leur protoplasme pour constituer des cellules multinucléées ou de se superposer en couches autour de corps étrangers.

La soudure des macrophages est plus ou moins parfaite.

(1) *C. R. de la Soc. de Biol.*, 28 novembre 1913.

(2) BORDET, *Traité de l'immunité*, p. 175.

Ainsi Havet (1), à propos d'une étude des lésions expérimentales de la leishmaniose, dit que les grandes cellules qu'il identifie avec les grands mononucléaires et qui sont bourrées de parasites, peuvent former des amas dans lesquels elles sont tassées, serrées au point qu'il est parfois difficile d'observer leurs limites individuelles; il ajoute que ces limites existent pourtant, si peu accusées qu'elles soient.

D'après nos constatations, le processus de l'apparition des cellules géantes comporterait le plus souvent deux temps, en passant par l'édification de syncytiums pour aboutir à la fragmentation de ceux-ci. Comme nous l'avons indiqué chez les mammifères, le processus ne se termine pas par la division du syncytium; les blocs qui en résultent se modifient peu à peu et cela suffit à expliquer les formes si variées des cellules géantes et la vraie nature des prolongements dont elles sont ornées. Des ouvrages récents voient encore dans ces prolongements des émanations amiboïdes et la preuve du rôle phagocytaire des cellules géantes. Peut-être ces prolongements sont-ils capables de mouvements actifs; la démonstration n'en est pas faite et ne paraît pas d'exécution commode. Nos observations prouvent à l'évidence qu'ils sont ordinairement des reliquats du protoplasme emporté par les cellules géantes au moment où elles se constituent en se disjoignant du syncytium morcelé. La théorie suivant laquelle les prolongements appartiendraient aux cellules épithélioïdes marginales dont la fusion a donné lieu aux cellules géantes doit être acceptée à titre secondaire. Certaines pointes de cellules géantes sont manifestement des cellules épithélioïdes, même parfois encore nucléées, non complètement englobées dans la masse commune (voir fig. 5).

Il eût été intéressant de contrôler la formation des cellules géantes dans la plupart des granulomes non tuberculeux. Nous avons dû nous borner à l'étude des seuls matériaux dont nous disposions. Les résultats que nous en avons obtenus sont confirmatifs de ceux que nous avons décrits à propos de la tuberculose; ils montrent que la filiation syncytiale des cellules géantes est un processus très répandu, probablement commun

(1) *Bull. de l'Acad. royale de Médecine de Belgique*, 1919.

à toutes les maladies dont les altérations se rapportent au granulome inflammatoire.

Quoi qu'il en soit de cette conclusion toute provisoire, puisqu'elle demande à être étayée de recherches pour chaque cas particulier, nous dirons deux mots de celles que nous avons faites sur la morve pulmonaire du cheval et sur l'actinomycose bovine.

La première de ces maladies évolue assez indirectement vers le granulome ; les caractères histologiques de celui-ci

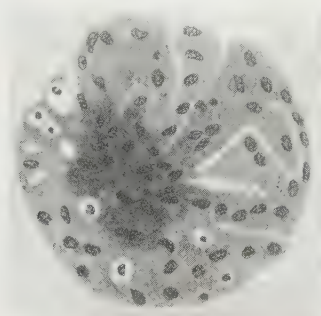


FIG. 14. — Symplaste en voie de division dans la paroi d'un tubercule morveux pulmonaire à la période de caséification.

n'apparaissent que secondairement, dans la coque conjonctive qui se forme autour de chacun des infarcti morveux après leur envahissement leucocytaire et leur mortification. Ladite coque conjonctive comporte une zone externe fibreuse et une interne, constituée essentiellement de tissu épithélioïde, pourvu ou non de cellules géantes. Quand ces dernières sont présentes, elles ressemblent en tout, y compris dans leur mode de développement, à celles de la tuberculose. Comme elles, elles procèdent généralement de masses syncytiales. La figure 14 montre la section de l'une de ces masses ; on peut y voir la concentration des noyaux en plusieurs points et aussi des cassures du protoplasme qui marquent le début de l'individualisation des cellules géantes.

La configuration assez spéciale des cellules géantes de l'actinomycose ne les éloigne pas autant qu'on pourrait le penser des précédentes. La figure 15 en fait foi. Voici tout d'abord, en



2, un granulome développé autour d'une colonie allongée; celle-ci est entourée de toutes parts d'une bande de symplaste dont les noyaux sont rejetés excentriquement.

Des lignes radiaires peu nettes y sont apercevables; elles rappellent celles que MM. Besnoit et Robin signalaient autour du protozoaire de leurs pseudo-tubercules cutanés du bœuf; elles ne peuvent être interprétées que comme des reliquats des plans suivant lesquels se sont soudées les cellules épithélioïdes qui s'implantaient perpendiculairement à la surface de l'actinomyète dans notre cas, du parasite dans celui des auteurs français. Dans la figure 15, 1, deux cellules géantes se sont déjà isolées du symplaste qui enveloppait tout d'abord la minuscule colonie centrale; leurs noyaux ont conservé la même position excentrique que ceux du symplaste lui-même.

Enfin, en 3, on ne distingue plus de syncytium; il s'est complètement transformé en cellules géantes fort inégales entre elles, mais ayant presque toutes une même conformation. En un seul endroit, on voit des cellules épithélioïdes au contact de la colonie parasitaire, comme on en peut rencontrer dans les tubercules de la bacilliose.

Cette figure démontre, on ne peut mieux, que les cellules épithélioïdes se sont d'abord noyées dans un symplaste, lequel a engendré de nouvelles cellules plus grandes que les premières.

#### VALEUR PHYSIOLOGIQUE DES CELLULES GÉANTES.

Les données précédentes sur la nature anatomique des cellules géantes étant établies, nous aborderons l'examen de leur valeur physiologique.

Rappelons tout d'abord que les différents auteurs qui ont contrôlé expérimentalement la formation des tubercules consécutivement à l'introduction de bacilles de Koch dans le sang ou dans la cavité péritonéale ont insisté sur cette particularité que, dans les premiers moments qui suivent l'injection, les bacilles sont entourés à peu près exclusivement par des leucocytes polynucléaires, lesquels ne font place qu'ultérieurement à des éléments au moins trois ou quatre fois plus gros que les polynucléaires, éléments pourvus d'un noyau vésiculeux et

riches en protoplasme, qui, en raison des formes qu'ils prennent, ont reçu le nom de cellules épithélioïdes. Ces deux caractères, tenant à leur volume et à l'abondance de leur protoplasme, se retrouvent dans les mêmes cellules des granulomes non tuberculeux.

Micro et macrophages sont toujours associés dans les exsudats, même aseptiques. Les premiers paraissent être les vrais agents de la lutte antimicrobienne; ils cèdent la place aux macrophages, lorsque la tâche est à peu près terminée, ces derniers se chargeant de détruire à la fois les microbes, les débris de cellules et même les cellules qui sont incapables de rentrer dans la circulation. Il est remarquable que l'injection expéri-

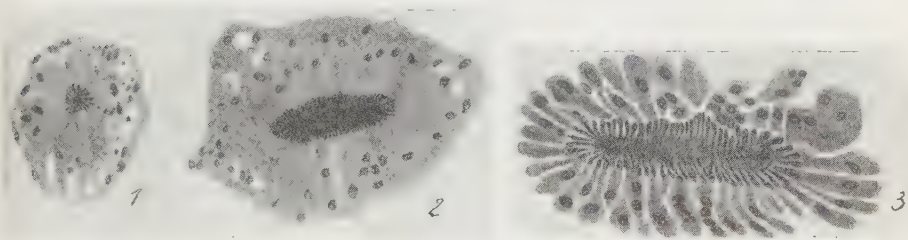


FIG. 15. — Tubercules de l'actinomycose du bœuf.

mentale de cellules animales (globules rouges, spermatozoïdes, etc.) ou végétales (levures, etc.) aux sujets de laboratoire provoque l'apparition prédominante des macrophages dans l'exsudat; il en est encore ainsi lorsqu'on injecte des poudres inertes, telles que lycopode, carmin, charbon de bois, etc. L'action des macrophages paraît ainsi mieux appropriée, sinon peut-être à une tâche plus rude, en tout cas à un effort plus durable et Bordet les considère comme les artisans les mieux qualifiés des processus chroniques (1).

Les épanchements séreux qui surviennent au cours des maladies diverses fournissent des indications concordantes : « La constatation d'une polynucléose dans ces épanchements dénote une infection aiguë, la lymphocytose trahissant au contraire les processus chroniques (tuberculose, syphilis) ou bien se manifestant au moment où les infections aiguës rétrocedent, c'est-à-

(1) *Traité de l'immunité*, p. 217.

dire lorsque les polynucléaires, ayant accompli leur tâche, peuvent se désister du conflit (1).

Les formes de la leucocytose, expression sanguine de la multiplication des globules blancs dans les organes hématopoïétiques, témoignent dans le même sens. A de nombreuses exceptions près, correspondantes à des microbes très actifs ou à des circonstances dans lesquelles l'organisme se défend mal, la polynucléose est le propre des maladies microbiennes aiguës (pneumonies, staphylo et streptococcie, appendicite); elle apparaît au début, atteint le maximum de son intensité à la période d'état, fléchit au moment du déclin, en même temps que la mononucléose s'affirme à son tour. Dans les maladies parasitaires, malaria, kala-azar, dans certaines maladies chroniques, tuberculose, syphilis, c'est au contraire la mononucléose qu'on observe surtout (2).

Ainsi les leucocytes polynucléaires, qui sont de tous les globules blancs la variété numériquement la mieux représentée dans le sang et dont le protoplasme est d'une grande mobilité, sont les phagocytes préposés à la défense permanente de l'économie contre les microbes. Les macrophages n'entrent en jeu que lorsqu'un effort supplémentaire ou un travail spécial de digestion intracellulaire deviennent nécessaires. Les grands mononucléaires sont peu nombreux dans le sang; ils y apparaissent après mobilisation ou multiplication dans les ganglions lymphatiques et dans la rate. Des macrophages peuvent sans doute se produire dans d'autres organes, notamment dans la moelle osseuse en cas de maladie, et aux dépens de l'endothélium des capillaires lymphatiques des tissus où le besoin de leur intervention se fait sentir.

Nous retiendrons de tout ceci que les digestions intracellulaires les plus durables incombent aux éléments les plus gros, les mieux pourvus de protoplasme. Aux invasions bactériennes aiguës, l'organisme oppose une résistance en mode de vitesse qui comporte la mobilisation des leucocytes polynucléaires ou microphages. Si l'effort doit être plus longtemps continué, ou plus grand, le même organisme paraît avoir avantage à réaliser en mode de masse le travail de défense qu'il s'impose.

(1) *Ibid.*, p. 220.

(2) BORDET. *Ibid.*, p. 223.



Ainsi, en va-t-il des moteurs animés dont l'homme a fait ses auxiliaires. Les chevaux de format léger, plus nerveux, plus actifs, sont utilisés surtout aux allures rapides, tandis que les sujets plus corpulents, moins excitable, sont réservés aux transports lents de lourdes charges.

Les cellules géantes sont des macrophages particulièrement volumineux. N'est-ce point pour répondre à la fonction qui leur est dévolue. La surface de la sphère augmentant seulement en raison du carré du rayon, tandis que le volume augmente comme le cube du même rayon, les cellules volumineuses, ont, relativement à leur masse, moins de surface que celles de petites dimensions. Par suite, les cellules géantes sont relativement mieux protégées contre l'action des toxines du milieu où elles vivent que les cellules épithélioïdes, pourtant déjà de belle grandeur si on les compare aux microphages. Ce phénomène d'appropriation se développe avec une ampleur remarquable lors de l'apparition des syncytiums, lesquels, pour une quantité de protoplasme égale à la sommation des protoplasmes des cellules épithélioïdes dont ils procèdent par coalescence, présentent une surface beaucoup moindre que les surfaces additionnées de ces derniers éléments. Dès lors, le champ exposé aux poisons microbiens se trouve rétréci et ceux qui sont introduits dans le protoplasme commun y sont notablement dilués, partant moins agissants, moins déprimants.

Mais la réduction des surfaces ne peut dépasser un certain degré sans désavantager les formations symplastiques qui en bénéficient. Elle entraîne en effet une réduction simultanée de l'apport des matériaux nutritifs indispensables. La fragmentation des symplastes y pourvoit, car elle a pour conséquence la création de cellules nouvelles, encore très volumineuses, donc encore fortement protégées contre l'intoxication du dehors, mais dont la surface extérieure agrandie assure mieux la nutrition. D'après les observations que nous avons relatées, la plupart des cellules géantes ont ce processus à leur origine. Dès qu'elles se disjoignent, la lymphe s'insinue dans leurs interstices et leurs noyaux se portent vers la périphérie, sans doute par l'effet d'attractions relevant du chimiotaxisme; mais il n'est pas impossible qu'il s'y ajoute l'effet répulsif exercé par

les toxines microbiennes dont l'action est constante au pôle central des cellules géantes.

Havet (1) considère les cellules volumineuses remplies de *Leishmania* et pouvant contenir des polynucléaires qu'il a vues dans les capillaires de ses animaux d'expérience, comme étant vraisemblablement de grands leucocytes mononucléaires qui ont pris des proportions plus grandes qu'à l'état normal. Peut-être en est-il ainsi; mais le doublement du noyau dans certains de ces éléments et les difficultés que l'on rencontre, comme nous l'avons rappelé plus haut, à reconnaître leurs limites dans les agglomérations nodulaires qu'ils forment, rendent très probable qu'ils subissent aussi des phénomènes de coalescence. Il est d'ailleurs tout à fait probable que l'importance de ces phénomènes sera en rapport avec les besoins de l'organisme dans chaque cas et que les cellules géantes pourront à l'occasion en naître directement, tandis que dans d'autres circonstances, elles n'en proviendront que secondairement, par la division de symplastes plus ou moins volumineux.

(1) *Bull. de l'Acad. royale de Médecine de Belgique*, 1919.

# LES PROPRIÉTÉS DES MICROBES LACTIQUES ; LEUR CLASSIFICATION

par PAUL VAN STEENBERGE.

## INTRODUCTION

Les premiers travaux parus sur l'étude de bactéries lactiques après leur découverte par Pasteur en 1857 avaient tendance à comprendre sous ce nom tous les microbes produisant de l'acide lactique en grande ou en petite quantité.

Pottevin comprit que cette classification devait nécessairement prêter à confusion et considéra comme *ferments lactiques actifs* ceux qui transforment le sucre en acide lactique à quelques centièmes près. Des multitudes de microbes à propriétés très différentes produisent en effet, entre autres acides, de l'acide lactique. Par les recherches d'Osterwalder nous savons que même les bactéries acétiques forment une petite dose d'acide lactique.

Beijerinck [1 et 2] a distingué la classe des *microbes lactiques actifs* en prenant pour base une série de caractères généraux. C'est exclusivement de cette classe de microbes que je m'occuperai dans cette étude et spécialement des espèces se rencontrant dans les industries de la fermentation alcoolique, notamment dans la distillerie et dans la brasserie.

Nous devons les premières connaissances sur les microbes lactiques d'abord à Pasteur et puis aux différents auteurs français qui ont complété ses études sur les maladies du vin, de la bière et du lait.

Mon distingué compatriote Van Laer nous fournit une étude approfondie de la maladie de la *tourne* de la bière, maladie déjà signalée sous ce nom par Pasteur.

L'importance du rôle joué par les microbes lactiques en distillerie donna lieu à plusieurs études dont la plupart se sont limitées à une espèce et dont celle de Henneberg, qui a



examiné une série d'espèces, a le plus étendu nos vues sur la constitution de cette classe de microbes.

Le peu de rapport qui me semble établi entre les différentes espèces de microbes lactiques et dès lors la difficulté de s'en faire un aperçu général clair m'a incité à en étudier comparativement toute une série.

Je donne immédiatement les caractères généraux des microbes lactiques actifs, à quelques changements près, tels que les a établis Beijerinck [1 et 2] :

1° Ils sont immobiles ;

2° Ils constituent des anaérobies facultatifs ;

3° Ils ne forment pas de spores ;

4° Ils exigent, comme nourriture, des hydrates de carbone déterminés et de l'azote peptonisé, ou de préférence tryptonisé ;

5° Ils forment de petites colonies sur milieu nutritif solide, même sur leur milieu préféré, le moût gélosé ou gélatiné, alors que dans de l'extrait de malt liquide la quantité de matériel microbien produit est relativement plus grande ;

6° Ils forment aux dépens des sucres attaqués, d'après l'espèce de microbe, soit de l'acide lactique, soit, en outre d'une quantité dominante d'acide lactique, une dose déterminée d'acide volatil et des doses toujours proportionnelles à ce dernier d'alcool et d'anhydride carbonique ;

7° Ils sont dépourvus de catalase, c'est-à-dire qu'ils sont incapables de décomposer  $H^2O^2$ . Ce caractère négatif est très spécifique pour les microbes lactiques, car d'après Beijerinck tous les autres microbes manifestent la réaction catalytique.

## ÉTUDE GÉNÉRALE

### A. — Répartition des microbes lactiques dans la nature.

#### Méthodes de récolte.

Les microbes lactiques sont très répandus dans la nature ; en général, on les trouve dans tous les extraits végétaux sucrés, sur les graines de céréales, dans le lait, dans les fèces de l'homme et des animaux, dans le sol, etc.

Le fait que les différentes espèces de microbes lactiques se distinguent entre elles par leurs propriétés spécifiques nous

donne le moyen d'isoler successivement les différentes espèces en faisant changer les conditions de culture. Les méthodes d'enrichissement et d'isolement employées par moi sont basées sur les quatre principes suivants dont les trois premiers ont été préconisés par Beijerinck [1 et 2] :

1° *La présence de la levure alcoolique favorise le développement des microbes lactiques vis-à-vis des autres micro-organismes.*

Cette méthode est recommandable pour l'extraction des microbes lactiques des milieux peu riches en ces espèces.

2° *La culture des microbes lactiques peut se faire à l'abri de l'air.*

La méthode de culture à l'abri de l'air (en flacon bouché à l'émeri et complètement rempli de milieu nutritif) est la plus commode pour la prolifération des microbes lactiques quand on a affaire à des matériaux riches en ces derniers.

3° *A des températures déterminées correspond la pullulation d'espèces déterminées de microbes lactiques.*

4° *L'autolysat de la levure de distillerie constitue un milieu favorable à l'accumulation de certaines espèces et est impropre au développement d'autres espèces.*

J'ai exposé dernièrement les détails de l'autolyse de la levure. En général les espèces de microbes lactiques nombreuses dans la levure fraîche de distillerie périssent rapidement pendant l'autolyse tandis que l'autolysat s'enrichit en des espèces de microbes lactiques peu représentées (1) dans la levure fraîche.

Il est évident qu'en dehors de ces 4 caractères mentionnés d'autres peuvent servir de base pour établir des méthodes de récolte de certaines espèces de ferments lactiques.

## ESPÈCES ÉTUDIÉES

J'ai étudié des espèces de microbes lactiques isolées :

a) DE LA LEVURE DE DISTILLERIE (de la « Nederlandsche Gist-en-Spiritusfabrick » à Delft) qui est bien de par son origine le milieu qui a le plus de chance de nous renseigner sur la mul-

(1) C'est le cas pour toutes les espèces isolées par la méthode de l'autolyse.

tiplicité des espèces de microbes lactiques de la nature, vu que sa constitution en microbes lactiques répond à celle de l'empâtage de distillerie, dont la composition hydrocarbonée et azotée fait le milieu favori des microbes lactiques.

J'ai isolé de la levure de distillerie une grande quantité d'individus dont, après examen comparatif superficiel, 17, me semblant être des espèces différentes, ont été étudiés de plus près; je les représenterai provisoirement par les chiffres romains de I à XV et les *B. delbrucki* et *Lactobacterium fermentum* par leur nom. Tous présentent la forme de bâtonnet (1), excepté XIV qui correspond au *Pediococcus acidi lactici* Lindner et XV qui est une petite sarcine.

Furent obtenus par la méthode d'enrichissement :

D'après les 1<sup>er</sup> et 2<sup>e</sup> principes à 30° : X, XI, XII;

D'après le 2<sup>e</sup> principe à 37° : XIV, *Lactob. fermentum*;

D'après les 1<sup>er</sup> et 2<sup>e</sup> principes à 45° : *B. delbrucki*;

D'après le 4<sup>e</sup> principe (méthode de l'autolyse) à 30° : I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII et IX; à 37° : XIV et XV; à 45° : XIV.

b) DE LA BIÈRE A FERMENTATION BASSE. — Plusieurs échantillons furent isolés; une espèce répondant au *Saccharobacillus pastorianus* décrit par Van Laer et que je représenterai par *Lb. past.* (*Lactobacterium pastorianum*); une autre espèce de bâtonnet différant légèrement du *Lb. past.* par plusieurs caractères et ne paraissant identique à aucune autre espèce de ferment lactique décrite; je la mentionnerai dans mes tableaux par *Lb. ce.* (*Lactobact. cerevisiæ*); comme troisième espèce une sarcine que j'appellerai « sarcine de bière ».

c) DU SOL (terre de jardin). — Un streptocoque que je propose de désigner sous le nom de *Streptococcus terricola* et une espèce présentant la forme de bâtonnet que je désignerai par le nom de *Lactobacterium terricola* (*Lb. terric.*). Une espèce de sarcine aussi isolée de la terre manifestait à peu près les mêmes propriétés que la « sarcine de bière ».

(1) Je propose d'admettre le nom *Lactobacterium* comme nom générique de toutes les espèces de ferments lactiques en forme de bâtonnet.



d) DES CROTTINS DE CHEVAL ET DES CRINS. — J'ai isolé des crottins et crins de deux écuries différentes : une espèce de sarcine produisant dans du moût à 10° Balling un maximum d'acidité (1) de 10 cent. cubes N p. 100; une espèce de *Lactobacterium* à propriétés analogues à celles du *Lactobacterium fermentum* Beijerinck et le *Lactococcus dextranicus* Beijerinck décrit d'abord par Van Tieghem sous le nom de *Leuconostoc mesenteroides*.

J'ai remarqué en général que les cultures initiales brutes obtenues par l'ensemencement du moût avec de la terre, des crottins de cheval ou crins, des fèces, de la levure de distillerie, atteignent une acidité plus élevée que les cultures obtenues par un repiquage dans un nouvel échantillon du même moût stérile; l'acidification diminue progressivement dans les cultures obtenues par repiquages successifs pour se maintenir ensuite constante dans les mêmes conditions de culture.

On pourrait d'abord croire à une action symbiotique des nombreuses espèces de microbes se trouvant dans la culture brute. Ceci ne paraît que peu probable, car si on tâche d'isoler de la culture initiale autant d'espèces différentes que possible, et qu'après on réensemence ensemble dans du moût à 10° Balling les cultures pures de toutes ces espèces, on n'obtient jamais une acidité aussi élevée que celle obtenue dans la culture brute initiale. D'ailleurs l'expérience m'a montré que la culture simultanée d'un mélange de plusieurs espèces de microbes lactiques ne produit, dans le cas le plus favorable, qu'une acidification égale à celle qu'est capable de provoquer le microbe lactique le plus acidifiant du mélange.

Le maximum d'acidité que j'ai pu obtenir après trente jours à 30° dans du moût à 10° Balling pour le microbe lactique le plus acidifiant de ma collection fut 19 cent. cubes 25 N p. 100, alors qu'en culture brute *Moût + terre*, dans les mêmes conditions, l'acidité s'élevait après quatorze jours à 25 cent. cubes 2 N p. 100, chiffre qui retombait à 9,4 après le premier repiquage.

Il reste à supposer que les microbes amenés de la nature dans

(1) L'acidité sera toujours exprimée par le nombre de centimètres cubes de KOH normal nécessaires pour la neutralisation (à la phénolphthaléine comme indicateur) de 100 cent. cubes de liquide.

nos milieux de culture manifestent leurs propriétés physiologiques, ou du moins certaines d'entre elles, d'une façon plus intense dans la première culture que dans les suivantes. C'est à se demander si nous parvenons à cultiver dans nos milieux les organismes avec les mêmes caractères, ou plutôt si nous parvenons à leur faire manifester les mêmes caractères que dans la nature. Nous savons en effet que les propriétés des êtres en général varient avec la nourriture qui est mise à leur disposition, ou plutôt avec les conditions de culture dans lesquelles ils sont placés. Il serait imprudent de qualifier toutes ces variations de « mutation », car il ne paraît pas douteux que dans bien des cas ces variations, qui consistent le plus souvent, du moins apparemment, dans la perte d'une propriété, ne sont souvent que temporaires, les propriétés perdues continuant à exister alors à l'état latent et prêtes à se manifester dès qu'on réalisera le milieu et les conditions de culture nécessaires à leur apparition. C'est comme s'il manquait dans ce cas au milieu de culture les éléments indispensables à la constitution des agents actifs porteurs des propriétés disparues. Cette façon de voir découle aussi des recherches de Buromsky qui a remarqué pour 9 espèces différentes de levure qu'elles s'accoutumaient bien au milieu minéral de Schukow (1), mais que les levures ainsi cultivées ne pouvaient provoquer la fermentation alcoolique parce qu'elles ne possédaient pas de zymase, alors que, réensemencées dans du moût, toutes les espèces de levure avaient recouvré, après quelques cultures successives, leur pouvoir de fermentation alcoolique initial.

Il en résulte qu'un milieu peut communiquer à un organisme des propriétés qui peuvent ne pas se manifester dans un autre milieu. Le changement se fait alors progressivement. C'est aussi l'avis de Bredeman qui dit avoir pu ramener plusieurs types de ferments butyriques décrits comme différents par divers auteurs à une même espèce après les avoir cultivés pendant six mois sur un même milieu. Il a ainsi montré clairement qu'avant de soumettre un microbe à une étude approfondie, il est recommandable de fixer préalablement ses propriétés par rapport à un milieu déterminé.

(1) Milieu de Schukow d'après Buromsky.

## B. — Morphologie des microbes lactiques.

Je n'attache que peu d'importance à la morphologie des microbes lactiques; la forme de leurs cellules paraît d'ailleurs variable dans une certaine mesure d'après les conditions de culture. Dans des conditions déterminées la forme constitue cependant une donnée utile dans l'identification de quelques espèces.

On trouvera à la fin de ce travail le dessin de la plupart des espèces étudiées, cultivées sur moût gélosé, de même que ci-après un tableau général I dans lequel je mentionne entre autres les dimensions de chaque espèce et l'aspect et la forme de leurs colonies sur moût gélosé, après quatre jours de culture à 32°. La largeur des cellules est généralement plus grande pour les cultures sur moût gélosé qu'en moût liquide.

Pour les espèces de *Lactobacterium* dont les individus s'associent en filaments plus ou moins longs suivant l'espèce, les cultures contiennent toujours inévitablement des bâtonnets de longueur inégale. En milieu de culture liquide les filaments sont plus longs que sur milieu solidifié.

## C. — Physiologie des microbes lactiques.

### I. Développement sur le moût gélosé.

L'aspect des colonies est variable avec l'âge de la culture. Quand elles sont très jeunes les colonies de toutes les bactéries lactiques sont transparentes, plus ou moins suivant l'espèce; elles s'opalisent progressivement pour être complètement opaques dès qu'elles atteignent un demi-millimètre de diamètre, ce qui est en général le cas après cinq jours à 30°, à condition qu'elles se trouvent suffisamment espacées dans la culture pour pouvoir bien se développer.

Les colonies des microbes lactiques n'atteignent jamais une grande dimension sur moût gélosé et gélatiné, alors que ce milieu constitue cependant leur terrain préféré et que leur multiplication paraît notablement plus intense dans du moût liquide. Dans les cultures pures de toutes les espèces de microbes lactiques on peut apercevoir deux espèces de colonies



grandes et petites, qu'on croirait à première vue correspondre à des espèces différentes de bactéries ; ceci n'est pas, car les deux espèces de colonies fournissent des individus qui manifestent les mêmes caractères physiologiques. Cette différence de croissance tient sans doute à ce que certains germes se développent plus vite que d'autres et par le fait même produisent des colonies plus grandes, vu qu'ils jouissent des meilleures conditions que le milieu de culture peut leur fournir. Sur une culture de moût gélosé où les colonies se trouvent serrées, toutes restent petites.

A mesure que l'âge de la culture avance sans que les colonies croissent encore, celles-ci se foncent progressivement et deviennent finalement brunes. Le brunissement (1) de la cellule ne s'opère qu'après la mort de celle-ci et d'autant plus vite que la température est plus élevée et que le contact de l'air est plus intime. Ainsi, si on place une culture au-dessus de la température optima de l'espèce examinée, le brunissement est très rapide. A la température ordinaire le brunissement est d'autant plus rapide que l'espèce de microbe résiste moins à l'influence nuisible de l'air et que la colonie est plus petite.

J'ai cultivé plusieurs espèces de microbes lactiques, comme cultures piquées, dans des tubes contenant une couche de moût gélatiné de 10 cent. cubes de haut, pour les soustraire au contact direct de l'air ; après un an toutes les colonies étaient encore blanches et leurs germes bien vivants.

Le phénomène du brunissement des colonies nous donne des indications concernant le moment du repiquage des cultures pures entretenues en collection, sur de nouveaux milieux nutritifs ; le moment désigné est celui où le brunissement commence à la surface des colonies.

Un autre phénomène caractérise encore le développement des microbes lactiques sur du moût gélosé ainsi que sur eau de levure gélosée additionnée d'un sucre attaquant par les microbes lactiques ; la diffusion de l'acidité formée dans le milieu provoque, dans un certain rayon autour de la colonie ou du champ de culture, la précipitation des

(1) Ce phénomène, attribué à une action oxydasique, paraît très général, chez les végétaux.

matières azotées rendues insolubles. Le trouble produit est d'autant plus grand et étendu que l'espèce cultivée forme plus d'acide.

Il va de soi que cette production de trouble dans les conditions citées n'est pas un caractère spécifique propre exclusivement aux microbes lactiques, car tout microbe faisant une dose suffisante d'acide peut produire ce phénomène; il donne cependant une indication sérieuse dans le sens de l'identification d'un microbe.

## II. Cultures dans l'extrait de malt.

L'action de microbes lactiques se manifeste dans les liquides nutritifs sucrés: 1° par la multiplication du microbe d'où résulte la production d'un trouble d'une intensité et d'une durée variables avec l'espèce de microbe; 2° par une acidification quantitativement et qualitativement variable avec l'espèce.

1. ASPECT ET DURÉE DU TROUBLE. — L'aspect du trouble provoqué dans la culture permet de diviser les microbes lactiques en deux groupes:

Premier groupe: *Les microbes lactiques floconneux*, que j'appelle ainsi parce que les individus de ces espèces se conglo-mèrent dans le liquide en flocons plus ou moins grands, suivant les espèces, qui se déposent facilement au fond de la culture, d'où résulte qu'ils ne troublent que peu la culture, qui du reste se clarifie complètement dès que la multiplication a cessé, ce qui correspond au moment où le liquide a atteint une acidité titrant 5 à 7 cent. cubes KOH N. par 100 cent. cubes (d'après les espèces). L'espèce VI, quoique devant se classer dans le groupe des floconneux, fait exception à cette règle; le liquide se clarifie plus lentement par le fait que la conglo-mération des cellules est imparfaite; en outre des flocons qui se déposent dans la culture il y reste en suspension des cellules isolées qui retardent notablement sa clarification. Il est remarquable que, pour les espèces floconneuses les plus typiques, le liquide ne se trouble pour ainsi dire pas pendant toute la période du développement; on voit en suspension dans

ESPÈCES	CULTURES SUR MOUT GÉLOSÉ		ORIGINE ET ACCUMULATION	TEMPÉRA- TURES Maximum Optimum Minimum au-dessous de 13°	ACIDIFICAT DES SUCRES ET
	DIMENSIONS ET ASPECT DES CELLULES	COLONIES après 4 jours à 32°			
<i>Lactobacterium filatim</i> (III)	1,3 — 4,6 : 1 $\mu$ . Chainettes jusqu'à 49 $\mu$ de longueur. En mout liquide, chaîne de longueur indéterminée.	Colonies réguliè- rement rondes de 1/3 à 1/2 millimètre de diamètre. — encore transparentes, en grande partie, peu cohérentes.	Origine : Levure de dis- tillerie. Accumulation : Par l'au- tolysé de la levure de distillerie à 30°; encore dans l'eau de levure mannitée.	37° 32-37°	Acidifie bien les lévulose, maltos- charose; peu trine, pas la lac- te le lait.
<i>Lactobacterium conglomeratum</i> (V)	1,3 — 2,6 : 1,15 $\mu$ . Cellules le plus sou- vent accouplées. Se présentent dans le liquide sous forme de conglomerats.	Colonies réguliè- rement rondes de 3/4 de millimètre de dia- mètre.	Origine : Levure de dis- tillerie. Accumulation : Par l'au- tolysé à 30° et isolément sur mout gélosé; aussi par culture dans de la levure additionnée de 5 p. 100 de mannite ou de 5 p. 100 de lactose.	40-44° 33-35°	Acidifie bien les lévulose, maltos- charose, lactos- trine et lait.
<i>Lactobacterium floccogenum</i> (I)	1,3 — 3 : 0,8 $\mu$ . Chainettes jusque 14 $\mu$ . En mout liquide, cel- lules isolées, ou par courtes chainettes. Conglomerats.	Colonies réguliè- rement rondes, relati- vement élevées, me- surant 1 millimètre de diamètre.	Origine : Levure de dis- tillerie. Accumulation : Par l'au- tolysé à 30° de la même façon que les espèces précédentes. L'isole- ment se fait très bien en ensemençant l'auto- lysat avec de la levure pure dans du mout 10°B. Il se forme des flocons de levure + microbe lac- tique d'où on isole ce dernier.	39° 30°	Acidifie bien les lévulose, maltos- charose, lactos- trine et lait.
<i>Lactobacterium parcifermentans</i> (II)	1 — 2,6 : 1 $\mu$ . Cellules isolées, as- sociées par 2 ou en chainettes. En mout liquide : 1 — 2,6 : 0,8 $\mu$ . Chaî- nettes. Conglomé- rats.	Colonies rondes en core à demi trans- parentes, de 1 milli- mètre de diamètre : — se développent étendues et peu éle- vées. — A la sur- face se forment, dès le 6 <sup>e</sup> jour, des stries concentriq. et une élévation au centre.	Origine : Levure de dis- tillerie. Accumulation : Par l'au- tolysé à 30°.	39° 28-32°	Acidifie bien les lévulose, sac- charose, dextrine un peu moins maltose.
<i>Lactobacterium multivolatigenum</i> (IV)	1,3 — 4,9 : 0,87 $\mu$ . Cellules isolées ou par 2; dans le mout liquide, formation de conglomerats.	Colonies blanches, rondes, cohérentes.	Origine : Levure de dis- tillerie. Obtenu par l'autolysé à 30°.	40-44° 35°	Acidifie bien les lévulose, maltos- charose, dextrin- le lactose et le l



ASPECT DE LA CULTURE DU MOÛT 10° B. — 60 du trouble à 30°.	MAXIM. D'ACIDITÉ TOTALE par 100 c.c. dans du moût de 10° Belling	ACIDE VOLATIL		DÉGAGEMENT DE CO <sup>2</sup> Pouvoir réducteur vis-à-vis du souteur, du bleu de méthylène, du lévulose	POUVOIR AGGLUTINANT vis-à-vis de la levure	NOCIVITÉ envers le développement et action fermentative de la levure lors d'un en- semencement simultané	DÉVELOPPEMENT dans du moût houblonné (0,45 p. 100 houblon) et dans la bière	ACIDIFICATION de la mannite	POUVOIR DÉCOMPOSANT des glucosides esculine et indican	POUVOIR D'INVERSION du saccharose
		par 100 c.c. de culture	p. 100 sur l'acidité totale							
qui ne se trouble déjà après 24 h. il se couvre de volumineux flo- cons au fond de la bou- teille; des flocons en sus- sension se déposent assez rapidement.	14,1	0	0	0	0	Faible.	0	+	0	+
Après 24 h. ± trouble; Après 42 h. et bril- lant clair après 60 h.; et de flocons compacts restant au fond et aux parois.	12,4	0,2	1,6	0	0	Faible.	0	+	+	+
Après 24 h.; d s flocons compacts se forment sur le fond et aux parois et y adhèrent; la culture se clarifie après quelques jours.	12,3	0,22	1,7	0	+	Relative- ment nota- ble.	0	+	+	+
Le moût trouble après 24 h. et se clarifie après 48 h. et reste clair après 60 h. Flo- cons assez volumineux.	9,1	1,2	13,2	+ lent	0	Faible.	0	—	0	—
Après 24 h.; claire Après 48-72 h.; petits flo- cons déposant au fond et adhérant aux parois sous forme de stries de en bas.	19,25	7,1	36,9	+ intense	0	Relative- ment faible.	0	Très faible.	0	+

ESPÈCES	CULTURES SUR MOUT GÉLOSÉ		ORIGINE ET ACCUMULATION	TEMPÉRA- TURES Maximum Optimum Minimum au-dessous de 13°	ACIDIFICATION DES SUCRES ET DU LAIT
	DIMENSIONS ET ASPECT DES CELLULES	COLONIES après 4 jours à 32°			
<i>Lactobacterium multivolaticum</i> (VI)	0,65 — 1,3 : 0,53 $\mu$ . Cellules isolées ou associées par 2 ou en chaînettes jus- que 13 $\mu$ . Dans le liquide : con- glomérats.	Colonies blanches, à stries concentri- ques quand elles sont étendues.	Origine : Levure de dis- tillerie. Obtenu par l'autolyse à 30°.	46-47° 35°	Acidifie bien les gl lévulose, maltose charose, peu la de le lait et la lactos
<i>Lactobacterium oligoacidificans</i> (VII)	1,3 — 4,3 : 0,87 $\mu$ . Cellules isolées ou associées par 2 ou en chaînettes jusque 15 $\mu$ (jusque 4,6 en mout liquide).	Colonies grisâtres, plates avec stries concentriques à la surface et élévation au centre; elles sont très cohérentes.	Origine : Levure de dis- tillerie. Obtenu par l'autolyse de la levure à 30°.	40-44° 32-35°	Acidifie bien les gl lévulose, maltose charose, relativ peu la dextrine et très peu la lactos
<i>Lactobacterium grave</i> (X)	1,6 — 2 : 1,15 $\mu$ . Le plus souvent par 2 cellules accou- plées, aussi en chaî- nettes (12,5 $\mu$ ). Dans mout liquide : 1 — 1,6 : 0,82 $\mu$ . Cel- lules isolées par 2 ou en courtes chaî- nettes.	Colonies blanches, étendues, peu éle- vées avec stries concentriques, et élévation au centre, mesurant 1 3/4 à 2 millimètres de diamètre.	Origine : Levure de dis- tillerie. Accumulation : Par l'en- semencement de la le- vure de distillerie frai- che dans du mout à 30°.	40-44° 35-37°	Acidifie bien les gl lévulose, maltose charose; modérér dextrine, très peu et pas la lactose.
<i>Lactobacterium listeri</i> (XI) ( <i>B. listeri</i> Hen- neberg).	1,3 — 2 : 1 — 1,3 $\mu$ . Cellules isolées, par 2 ou en courtes chaî- nettes (jusque 14 $\mu$ ). Dans mout liquide : 1,3 — 2,3 : 0,87 $\mu$ . Cellules isolées ou par 2 ou courtes chaînettes (7,3 $\mu$ ).	Colonies blanches, rondes de 1 milli- mètre de diamètre.	Origine : Levure de dis- tillerie. Accumulation : En ense- mençant de la levure de distillerie fraîche dans du mout à 30°, il se forme des flocons de levure et du lactobet listeri, d'où on isole ce dernier.	40-44° 37°	Acidifie bien les gl lévulose, sacch peu la dextrine peu le lait et pas tose.
<i>Lactobacterium viscogenum</i> (XIII)	1,65 — 12,5 : 0,66 $\mu$ .	Colonies visqueuses brunâtres, plates atteignant 1 milli- mètre de diamètre après 7 jours. Après les colonies devien- nent sèches et très cohérentes.	Origine : Levure de dis- tillerie. Isolé d'une culture de le- vure de distillerie dans du mout à 37°.	36-39° 33-34°	Acidifie bien la m et la galactose; bien la saccharos lévulose; moins cose et la dextrin le lait et pas la l

ASPECT DE LA CULTURE DU MOÛT 40° B. — ée du trouble à 30°.	MAXIM. D'ACIDITÉ TOTALE par 100 c.c. dans du moût de 10° Balling	ACIDE VOLATIL		DÉGAGEMENT DE CO <sub>2</sub> Pouvoir réducteur vis-à-vis du soufre, du bleu de méthylène, du lévulose	POUVOIR AGGLUTINANT vis-à-vis de la levure	NOGIVITÉ envers le développement et action fermentative de la levure lors d'un en- semencement simultané	DÉVELOPPEMENT dans du moût houblonné (0,45 p. 100 houblon) et dans la bière	ACIDIFICATION de la mannite	POUVOIR DÉCOMPOSANT des glucosides esculine et indican	POUVOIR D'INVERSION du saccharose
		par 100 c.c. de culture	en p. 100 sur l'acidité totale.							
ole après 24 h.; flocons denses; floculation parfaite; le liquide se ifie après ± 10 jours.	17,2	6,2	35,0	+ intense.	0	Relative- ment faible.	0	Très faible.	+ lent et faible.	+
ole après 24 h.; ma- ste le phénomène « de ourne », se clarifie s 8 jours.	8,5	1,11	13,0	+	0	—	0	0	0	0
ole après 24 h.; mon- le phénomène de la ne; pas de flocons; re après 48 h. et bril- e après 70 h.	10	0,85	8,5	+	0	Faible.	0	0	+	0
ole après 24 h.; phé- ène de la tourne; claire s 20 jours.	11	1,5	13,6	+	+	Très notable.	0	0	0	0
ole après 24 h. avec uction de matière vis- se qui se dépose s 4-5 jours; claire s 10 jours.	9,5	1,25	13,1	+	+	Forto.	0	0	—	0



ESPÈCES	CULTURES SUR MOUT GÉLOSÉ		ORIGINE ET ACCUMULATION	TEMPÉRA- TURES Maximum Optimum Minimum au-dessous de 13°	ACIDIFICA- TION DES SUCRES ET
	DIMENSIONS ET ASPECT DES CELLULES	COLONIES après 4 jours à 32°			
<i>Lactobacterium fermentum</i> ( <i>Lactobacillus fermentum</i> Beijerinck.)	3 — 33 : 0,87 $\mu$ . En mout liquide : 3 — 43 : 0,8 $\mu$ .	Colonie ronde, blanche.	Origine : Levure de distillerie. Accumulation : En ensemençant de la levure de distillerie fraîche dans du mout dans une bouteille remplie et fermée, à 37°.	48-49° 37°	Acidifie les glucosides, maltose, rose; relativement la lactose; peu la dextrine et le lait.
<i>Lactobacterium</i> ( <i>B. delbrucki</i> <i>Leichmann</i> ).	3 — 30 : 0,87 $\mu$ . Dans mout liquide : 3 — 50 : 0,8 $\mu$ .	Colonies légèrement foncées, plates, à surface et rebords crénelés.	Origine : Levure de distillerie. Accumulation : En ensemençant de la levure de distillerie fraîche dans du mout à 45°.	4 40-45°	Acidifie les glucosides, saccharose; relativement la lactose et peu la dextrine.
<i>Lactobacterium pastorianum</i> ( <i>Saccharobac. pastorianus</i> van Laer).	2 — 21 : 0,9 — 1 $\mu$ . Celluloses isolées ou accouplées.	Colonie peu élevée, légèrement foncée, à surface et circonférence crénelées.	Origine : Bière tournée.	39° 26-30°	Acidifie les glucosides, maltose, rose, galactose; le lait et pas la dextrine.
<i>Pediococcus acidilactici</i> Lindner.	1 à 1,15 $\mu$ .	Colonies blanches, rondes.	Origine : Levure de distillerie. Accumulation : Par l'autolyse de la levure de distillerie à 45°.	Au delà de 47° 35-40°	Acidifie les glucosides, maltose, rose, dextrine; peu le lait et pas la lactose.
<i>Streptococcus terricola</i> .	1,3 $\mu$ .	Colonies rondes, brunâtres	Origine : Sol. Accumulation : En ensemençant de la terre de jardin dans du mout à 45°.	Au delà de 45° 35-40°	—
<i>Lactococcus dextranicus</i> Beijerinck.	0,82 $\mu$ .	Colonies blanches, rondes. — Sur eau de levure a élevé + 5 p. 100 saccharose, il forme des larges colonies visqueuses de dextrane.	Origine : Crottins de cheval. Accumulation : Dans eau de levure contenant 5 à 10 p. 100 de saccharose.	Maximum : pour le développement : au delà de 47°. Pour la formation de dextrane : 35-40°. Optimum : 30-35°.	Acidifie bien la lactose et la saccharose; relativement le glucose, maltose; moins la lactose; peu le lait.

ASPECT DE LA CULTURE S DU MOÛT 10° B. — rée du trouble à 30°.	MAXIM. D'ACIDITÉ TOTALE par 100 c.c. dans du moût de 10° Balling	ACIDE VOLATIL		DÉGAGEMENT DE C <sub>2</sub> Pouvoir réducteur vis-à-vis du soufre, du bien de méthylène, du lévulose	POUVOIR AGGLUTINANT vis-à-vis de la levure	NOCIVITÉ envers le développement et action fermentative de la levure lors d'un en- semencement simultané	DÉVELOPPEMENT dans du moût houblonné (0,15 p. 100 houblon) et dans la bière	ACIDIFICATION de la mannite	POUVOIR DÉCOMPOSANT des glucosides esculine et indican	POUVOIR D'INVERSION du saccharose
		par 100 c.c. de culture	en p. 100 sur l'acidité totale							
ble après 12 h. à 37°; ifeste distinctement phénomène « de la ne ».	7,8	0,81	10,4	+ rapide.	0	Faible à 30° et en des- sous, nota- ble à 37°.	0	0	—	0
ble après 12 h. à 45°; nomène « de la tourne » s une mesure pronon- ; claire après 4-5 jours.	11,3	0	0	0	0	Faible.	0	0	—	—
ble après 24 h.; mani- e « la tourne »; claire ès 13 à 15 jours.	8,1	0,74	9,13	+ lent et faible.	0	Faible.	+	0	—	0
ble après 24 h., claire ès 8 jours.	5,5	0,15	2,7	0	0	Très faible.	0	0	0	0
e après 3-7 jours.	3,55	0	0	0	0	—	—	—	—	—
ble après 24 h.	7,1	1,19	16,8	+	0	—	—	—	—	+

la culture des flocons entre lesquels le liquide paraît tout à fait clair, les cellules s'agglutinent au fur et à mesure de leur production et se déposent assez rapidement pour que dans le liquide il n'y ait jamais assez de corpuscules en suspension pour y occasionner un véritable trouble.

La production de flocons peut se faire de deux façons différentes : *a) par l'aggrégation* (1) [fig. 4] *de cellules* d'abord isolées

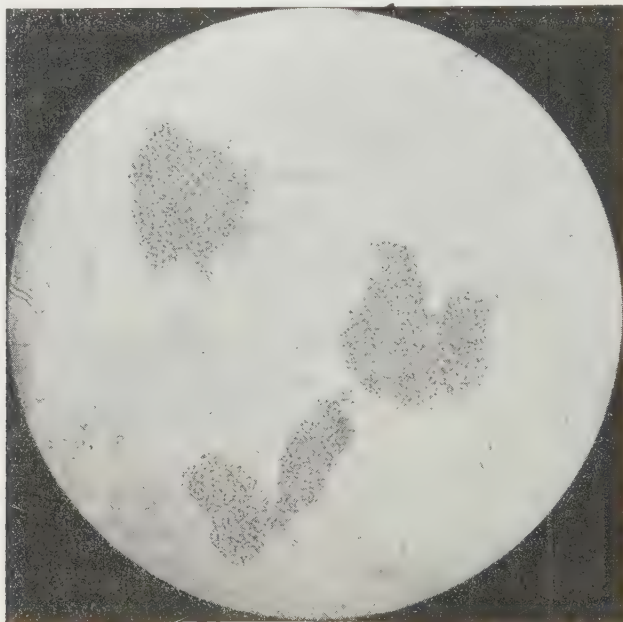


FIG. 4. — *Lactobacterium conglomeratum*.

Flocculation par congloération par agglutination des cellules. (Gr. : 390.)

ou en courtes chainettes en paquets plus ou moins grands de forme irrégulière; c'est le cas pour la plupart des espèces floconneuses; *b) par accroissement des cellules*; celles-ci, tout en se multipliant, restent accolées par les extrémités pour former ainsi des chaînes de longueur indéterminée, ressemblant à des filaments mycéliens et qui, en s'enroulant sur elles-mêmes et en s'entre-

(1) Les espèces floconneuses par aggrégation adhèrent généralement par petits flocons aux parois et au fond des récipients de culture. Cette propriété peut faciliter leur isolement. Les espèces floconneuses par accroissement (*lactob 'filatim*) n'adhèrent pas aux récipients de culture.



croissant, donnent naissance à de grands flocons (fig. 2) d'apparence légère, mais qui se déposent rapidement. Nous trouvons un spécimen typique de cette dernière forme de floculation dans l'espèce III que je propose d'appeler *Lactobacterium filatim*.

Deuxième groupe : *Les microbes lactiques non floconneux, ou de la tourne*.— Les espèces de ce groupe ne se conglomèrent pas en flocons, restent au contraire isolées ou associées par deux

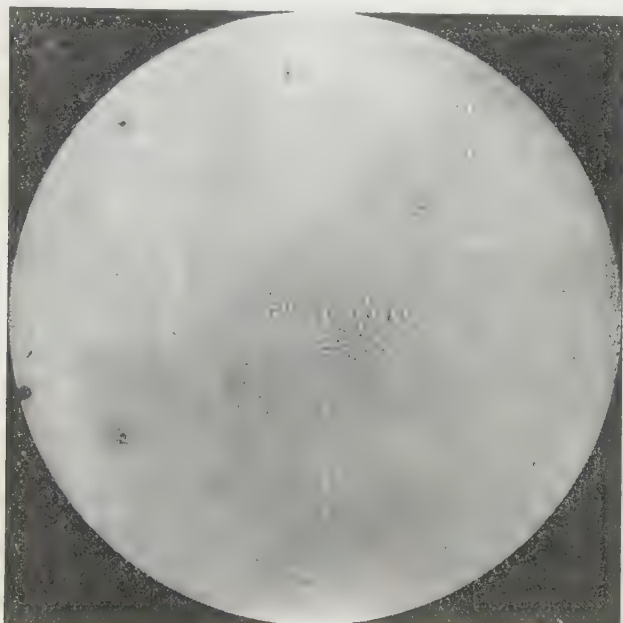


FIG. 2. — *Lactobacterium filatim*. Floculation par accrescence. (Gr. : 390.)

cellules ou en courtes chaînettes; il en résulte que leurs cultures en milieu liquide se clarifient beaucoup plus lentement et, pour certaines espèces, très lentement. Il peut arriver cependant que, dans les cultures âgées de certaines de ces espèces, il s'établisse une légère conglomération.

Pasteur a signalé les premiers représentants de ce groupe de *Lactobacterium* comme occasionnant dans le vin et dans la bière un mal qu'il appelait *maladie de la tourne*. Cette dénomination se justifie par le fait que, quand on imprime un mouvement giratoire aux cultures en milieu liquide de ces espèces

de microbes, le matériel microbien se soulève, les cellules se meuvent dans le liquide suivant le sens de leur longueur et y provoquent des ondes soyeuses. Tous les microbes présentant la forme de bâtonnet et qui ne se conglomèrent pas, manifestent le phénomène de la tourne et d'une façon d'autant plus caractéristique que l'espèce examinée forme des cellules ou des filaments de cellules plus longs.

Dans le tableau II sont mentionnés l'aspect des cultures et la durée du trouble dans du moût à 10° B. pour une série d'espèces de microbes lactiques (1) à différentes températures. Dans une colonne « Remarques » sont présentées les observations invariables avec la température. Au-dessus de 20° le développement se fit généralement avant les vingt-quatre heures après l'ensemencement; à 20° il se fit avant les quarante-huit heures et à 13° il ne fut visible en général pour toutes les espèces que le cinquième jour. La marque O indique qu'aucun développement n'eut lieu; la marque — indique qu'un essai correspondant ne fut pas fait.

Le trouble des cultures devient d'autant plus intense et d'autant plus durable que la concentration du milieu nutritif est plus grande.

2° ACIDIFICATION DU MOUT. — J'ai d'abord déterminé les maximum, optimum et minimum de température des espèces étudiées. Il n'est pas douteux que par des expériences rigoureuses on parviendrait à établir, spécialement pour l'optimum, des températures légèrement différentes pour le développement d'une part, et pour l'acidification d'autre part; dans peu de cas en effet, la multiplication et l'action enzymatique d'un microbe trouvent leur optimum à la même température. Cette distinction ne m'a pas occupé et je me suis limité à déterminer les *températures d'acidification*.

La température optimum n'est pas une valeur absolue, car elle varie avec la durée de l'acidification, elle est d'autant plus basse que le degré d'acidité du milieu est plus élevé. Des tubes conte-

(1) Dans beaucoup de mes expériences, je n'ai pas compris les espèces *Lactobact. delbrucki* LEICHMANN et *Lactob. fermentum* BEIJERINCK, parce qu'elles ont déjà fait l'objet d'une étude spéciale, la première par HENNRBERG [4] et la seconde par SMIT.

TABLEAU II.

ESPÈCES	REMARQUES générales	NOMBRE DE JOURS après lequel les cultures sont devenues claires à différents degrés									
		à 45°	à 40°	à 37°	à 35°	à 32°	à 30°	à 28°	à 24°	à 20°	à 13°
I	Formation de petits flocons adhérent au fond et aux parois du vase de culture.	0	0	2	2	2	2	3	3	4	8-10
II	Formation de flocons ne manifestant aucune adhérence au verre.	0	0	2	2	2	2	2	3	3	7
III	Flocons volumineux ne manifestant aucune adhérence au verre.	0	0	Ne se trouble pas; les flocons se déposent à mesure de leur formation.							
IV	Petits flocons adhérent au verre.	0	2-3	2-3	2-3	2-3	3	3	3	4	8-9
V	Id.	0	2	2	2	2	2	2	2	3	7
VI	Flocons assez grands adhérent au verre et cellules non agglomérées.	2	4	—	6	—	7	—	8-10	—	—
VII	Phénomène de la tourne peu accentué.	0	2	—	6	—	8	—	10	—	—
VIII	Id.	0	4	—	6	—	10	—	10	—	—
IX	Petits flocons adhérent au verre.	0	2	2	2	2	2	2	2	3	7
X	Phénomène de la tourne.	0	2	2	2	2	2	2	2	3	6-7
XI	Id.	0	5	5	5	8	18	18	18	22	—
XII	Id.	0	3	6	8	10	14	15	17	20	22
XIII	La culture devient visqueuse après 24 heures, plus fluide après (5 jours à 30° par exemple).	0	—	—	—	—	8-10	—	—	—	—
XIV	—	2	6	—	10	—	10	—	10	—	10
XV	—	0	4	—	10	—	10	—	—	—	—
<i>Lb. past.</i>	Phénomène de la tourne.	0	—	—	—	—	13-15	—	—	15-17	—
<i>Lb. Ce.</i>	Id.	0	—	—	—	—	10-12	—	—	14	—



nant 10 cent. cubes de moût stérile à 10° B. furent ensemencés respectivement par chaque espèce et placés aux différentes températures d'examen.

Les acidités exprimées par le nombre de cent. cubes de KOH N nécessaires à la neutralisation de 100 cent. cubes de culture avec la phénolphthaléine comme indicateur sont consignées dans le tableau III.

TABLEAU III.

ESPÈCES	ACIDITÉ APRÈS 3 JOURS DE CULTURE A								
	45°	40°	37°	35°	32°	30°	28°	24°	20°
I	0	0	7,2	7,4	7,5	8,0	7,6	6,4	5,2
II	0	0	4,4	3,3	4,4	4,4	4,4	—	3,1
III	0	0	6,2	6,2	6,2	5,2	4,8	—	3,5
IV	0	6,9	8,7	8,6	8,4	8,3	8,0	7,1	5,2
V	0	6,7	7,6	8,4	8,0	6,7	6,9	6,7	4,9
IX	0	6,9	8,4	8,7	8,0	8,0	7,1	6,9	5,5
X	0	5,3	5,8	5,8	5,3	4,9	5,3	—	4,4
XI	0	5,5	6,4	6,2	5,8	5,5	—	—	—
XII	0	6,4	6,1	5,3	5,8	5,5	—	—	—
ACIDITÉ APRÈS 6 JOURS DE CULTURE									
VI	3,0	7,3	—	11,2	—	7,3	—	—	—
VII	0	5,8	—	7,3	—	6,7	—	—	—
VIII	0	3,8	—	6,4	—	6,5	—	—	—
XIV	6,0	8,6	—	8,6	—	6,7	—	—	—
XV	0	3,1	—	4,1	—	3,0	—	—	—
<i>Lactob. cer.</i> . . . . .	0	0	—	0	—	7	—	6,4	—
— <i>past.</i> . . . . .	0	0	—	3,2	—	4,8	—	4,6	—
Sarcine de bière . . . .	2,4	2,6	—	2,7	—	2,4	—	2,4	—
<i>Lactob. terric.</i> . . . .	4,0	4,0	—	3,7	—	3,3	—	3,3	—
<i>Streptoc. terric.</i> . . . .	4,2	4,2	—	4,4	—	4,0	—	4,0	—
XIII (après 8 jours) . .	0	0	—	8,4	—	8,0	—	—	—

Les données du tableau III légèrement complétées nous permettent de dresser un tableau IV mentionnant les températures maximum et minimum pour le développement et l'acidification et l'optimum pour l'acidification après un temps indiqué ci-dessus.

On peut remarquer qu'avec quelques *Lactobacterium*, les coques et sarcines étudiés se développent aux températures les plus élevées.

J'ai cru utile de savoir quelle acidité peuvent provoquer différentes espèces de microbes lactiques en des espaces de temps variables et à différentes températures. J'aiensemencé à cette fin les espèces mentionnées ci-après dans du moût de 10° B., dans des bouteilles fermées à l'émeri; cette dernière précaution eut comme raison d'éviter l'évaporation des liquides

TABLEAU IV.

ESPÈCES	TEMPÉRATURE		
	MAXIMUM	OPTIMUM	MINIMUM
I	39°	30°	En dessous de 13° centigrades.
II	39°	28-32°	
III	37°	32-37°	
IV	40-44°	35-37°	
V	40-44°	32-35°	
VI	46-47°	35°	
VII	40-44°	32-35°	
VIII	40-44°	30-33°	
IX	40-44°	35°	
X	40-44°	35-37°	
XI	40-44°	35-37°	
XII	40-44°	40°	
XIII	36-39°	33-34°	
XIV	> 47°	35-40°	
XV	40-44°	35-37°	
<i>Lactobacterium delbrucki</i> . . .	54°	42-45°	
— <i>fermentum</i> . . .	48-30°	37°	
— <i>cer.</i> . . . . .	33-35°	28-30°	
— <i>pastorianum</i> . . .	39°	26-30°	
Sarcine de bière . . . . .	> 45°	35-40°	
<i>Lactococcus dextranicus</i> . . .	> 47°	30-35°	
<i>Streptococcus terricola</i> . . . .	> 45°	35-40°	
<i>Lactobact. terricola</i> . . . . .	> 54°	40-45°	

de culture pendant l'expérience. Les résultats se trouvent au tableau V.

Le tableau V nous montre, comme le fit déjà le tableau II, qu'en dessous de l'optimum la rapidité de l'acidification diminue avec la température de culture; elle diminue encore avec l'acidité acquise du milieu et avec l'âge de la culture; nous voyons en effet que l'acidification est la plus intense pendant la

première période pour diminuer progressivement après, jusqu'à atteindre un maximum déterminé d'acidité totale. Pour une espèce déterminée de microbe lactique, le maximum final d'acidité est indépendant de la température de culture.

Nous apprenons de plus que l'acidification se fait assez lente-

TABLEAU V.

ESPÈCES	ACIDITÉ PRODUITE DANS DU MOUT A 10° B												
	à 30° après					à 30° après					à 13° après		
	3 j.	6 j.	10 j.	20 j.	30 j.	3 j.	6 j.	10 j.	20 j.	30 j.	7 j.	20 j.	30 j.
I	7,7	11,2	13,3	—	14,4	4,9	8,2	10,3	—	14,0	4,7	8,6	10,1
II	4,3	4,7	5,2	6,0	7,1	3,0	3,9	4,0	4,9	5,6	2,8	—	4,0
III	4,9	6,4	9,7	13,5	14,8	3,4	5,6	7,4	10,3	11,6	3,2	6,9	7,7
IV	8,0	11,0	13,0	—	20,0	4,9	8,0	10,1	12,9	15,5	5,6	9,0	10,8
V	6,4	9,2	12,0	14,2	14,4	4,7	7,4	9,9	12,7	12,9	4,7	9,0	11,0
IX	7,7	10,5	12,9	14,6	—	5,4	8,2	10,3	12,4	13,9	5,6	8,6	9,5
X	4,7	6,0	7,9	9,0	10,1	4,0	5,2	6,0	8,6	9,5	4,3	—	6,4
XI	5,4	—	8,2	11,6	—	—	5,6	6,7	8,6	10,1	4,3	—	7,1
XII	5,4	—	8,6	11,6	11,8	—	—	7,3	9,9	11,2	5,2	—	7,1

ment pour la plupart des espèces même à leur optimum de culture; le *Lactob. delbrucki* et *Lactob. fermentum* opèrent une acidification beaucoup plus rapide.

Dans un tableau suivant VI j'indique le *maximum d'acidité* pour chaque espèce dans du moût à 10° B. Comparativement je fis quelques expériences dans du moût à 20° B. pour me rendre compte de l'influence de la concentration du milieu nutritif sur le degré d'acidité atteint. Les expériences eurent lieu dans des bouteilles fermées à l'émeri et à 30°.

Les tableaux VI et précédents peuvent donner lieu à quelques considérations sur le *mécanisme de l'acidification*. Nous voyons qu'elle est notablement plus intense dans du moût à 20° B. que dans celui à 10° B. Ceci est une conséquence directe d'une multiplication plus intense dans le premier cas; plus le moût est concentré, plus forte est la multiplication. L'acidification, par le fait qu'elle est proportionnelle à la concentration du moût, est proportionnelle au nombre de cellules présentes, d'où résulte la conclusion que chaque cellule d'une espèce déter-

minée de microbe lactique peut provoquer aux dépens du sucre une dose limitée (1) et fixe d'acide.

Lorsque la culture atteint, d'après les espèces, 5 à 7 cc. N p. 100

TABLEAU VI (1).

ESPÈCES (2)	ACIDITÉ PRODUITE A 30°			
	DANS DU MOÛT A 10° BALLING			DANS DU MOÛT A 20° B après 35 jours
	après 34 jours	après 4 mois	après 6 mois	
I	14 + (3)	14,2 0 (3)	— 0	22,0
II	9,2 +	8,7 0	— 0	—
III	15,2 +	17,3 0	17,6 0	20,0
IV	19,7 +	22,2 +	23,0 +	24,5
V	14,4 +	14,4 0	— 0	20,0
VI	17,6 +	18,8 +	19,0 +	22,5
VII	9,2 +	9,2 +	— +	—
VIII	9,3 +	9,4 +	9,6 +	—
IX	14,9 +	18,4 0	— 0	21,5
X	11,0 +	11,3 +	— —	—
XI	11,0 +	11,0 +	— 0	15,5
XII	11,4 +	11,4 +	11,6 0	13,0
XIII	9,5 +	— —	— —	—
XIV	8,6 +	9,0 +	— —	15,0
XV	6,7	—	—	—
<i>Lactob. cer.</i> . . . . .	8,8	—	—	—
— <i>past.</i> . . . . .	8,1	8,3	—	—
<i>Sarcine de bière</i> . . . .	4,5	—	—	—
<i>Lactoc. dextranicus</i> . . .	7,1	—	—	—
<i>Streptoc. terric.</i> . . . .	3,5	3,5	—	—
<i>Lactob. terric.</i> . . . . .	3,8	3,8	—	—

(1) Je n'ai fait la première détermination d'acidité qu'après 34 jours, parce que les essais du tableau V m'avaient montré que pour les cultures de la plupart des espèces l'acidité augmente durant tout le premier mois.

(2) Le *Lactob. delbrucki* et le *Lactob. fermentum* atteignent, à leur optimum respectif de 45° et 37°, leur maximum d'acidité après 3 jours de culture, qui est de 11,3 pour le premier et, d'après Smit (1), 13,2 pour le *Lactob. fermentum*.

(3) Les signes + et 0 indiquent respectivement si oui ou non la culture contenait, au moment du titrage, encore des individus vivants.

(1) On pourrait vouloir chercher la raison de la limite à l'acidification dans le fait que l'action enzymatique se trouverait entravée par l'acidité formée dans le milieu. Cette hypothèse me paraît invraisemblable pour la raison que le maximum d'acidité est différent pour chaque espèce de microbe lactique et qu'il ne me paraît pas logique de reconnaître aux enzymes acidifiantes des différentes espèces, une résistance différente aux acides alors que leur action qualitative est la même et qu'il y a donc tout fond pour croire qu'elles sont aussi de même nature.



d'acidité, toute multiplication du microbe se trouve arrêtée; l'acidification au contraire continue par les cellules présentes, jusqu'à un maximum d'acidité totale, variable pour chaque espèce mais constant pour une même espèce dans les mêmes conditions de milieu. Le maximum d'acidité une fois atteint reste invariable dans le milieu de culture.

Le même tableau VI nous montre encore que les espèces de microbes lactiques, jouissant du pouvoir acidifiant le plus intense, se trouvent dans le groupe des microbes lactiques floconneux (voir tabl. II).

Au point de vue de la *nature de l'acidité produite* on peut diviser les microbes lactiques en 1° *microbes lactiques vrais*, produisant *exclusivement* de l'acide lactique et 2° ceux qui, à côté d'une quantité dominante d'acide fixe, constitué par de l'acide lactique et une trace d'acide succinique (d'après Gayon et Dubourg [1], Bertrand et Duchaček et Smit), produisent de l'acide volatil en dose variable avec l'espèce. Pour les espèces de ferments lactiques examinées par Kayser [1], Bertrand et Duchaček et Smit, l'acidité volatile était constituée par de l'acide acétique et par une trace d'acide formique. Pour ma part, je n'ai pas procédé à l'analyse qualitative de l'acidité, je me suis contenté de déterminer comparativement par la méthode de Duclaux l'acidité fixe et volatile formée par chaque espèce de ma série de microbes lactiques. Pour toutes les espèces j'ai obtenu par distillation fractionnée des chiffres à peu près analogues à ceux trouvés par Smit et par moi-même pour le *Lactob. fermentum*, espèce pour laquelle Smit a soigneusement analysé les produits de fermentation et attribué l'acidité volatile à de l'acide acétique et de l'acide formique. Ces données me font croire que les acides volatils produits par toutes les espèces de microbes lactiques du deuxième groupe sont les mêmes, notamment de l'acide acétique et de l'acide formique.

La production d'acides volatils par les microbes lactiques est toujours accompagnée d'un développement de  $\text{CO}_2$ ; c'est pourquoi j'appellerai dans la suite assez souvent les espèces du deuxième groupe, les *microbes lactiques producteurs de  $\text{CO}_2$*  par opposition aux *microbes lactiques vrais, non producteurs de  $\text{CO}_2$* . De plus, pour toutes les espèces du deuxième groupe, la quantité de  $\text{CO}_2$  produite est proportionnelle à la dose d'acide volatil,

d'où résulte que la détermination de  $\text{CO}^2$  donne la mesure de l'acidité volatile et *vice versa*. Ce fait peut rendre service dans la classification rapide et facile des microbes lactiques dans un des deux groupes.

Pour me rendre compte du dégagement de  $\text{CO}^2$  j'ai commencé respectivement toute une série d'espèces dans du moût stérile à  $10^\circ$  B. dans des bouteilles stériles complètement remplies et fermées à l'émeri; les essais furent placés à  $30^\circ$ . Dans le cas de dégagement de gaz, celui-ci produit de la mousse entre le goulot de la bouteille et le bouchon et entraîne par son échappement une partie du liquide d'autant plus grande que la production de gaz est plus intense et plus rapide. Il est vrai que cette méthode d'appréciation du dégagement de  $\text{CO}^2$  n'est pas parfaite, car il peut y avoir des espèces de microbes lactiques produisant si peu de  $\text{CO}^2$  que celui-ci reste en solution dans la culture: je suis persuadé que ceci est le cas pour les espèces I, V, IX dont les cultures ne donnent lieu à aucun dégagement apparent de  $\text{CO}^2$  et accusent cependant des traces d'acide volatil et d'alcool; je mentionne ici en plus l'alcool, parce que les différents chercheurs qui se sont occupés de la fermentation lactique se sont prononcés pour une production parallèle et proportionnelle d'alcool et de  $\text{CO}^2$ .

Un moyen relativement sensible de se rendre compte de la présence de  $\text{CO}^2$  dans la culture, et dont on peut se servir dans un cas douteux, consiste à plonger précipitamment dans la culture un gros fil de platine chauffé au rouge; dans le cas de présence de  $\text{CO}^2$  il se produit dans le liquide un bruissement doux avec échappement de gaz le long du fil, de façon à provoquer autour du fil de platine à la surface du liquide une mousse plus ou moins étendue suivant que la culture contient plus ou moins de gaz.

S'il n'y a pas présence de  $\text{CO}^2$  il se produit au contraire un bruissement aigu, sifflant et il ne se forme aucune mousse.

Je communique dans le tableau VII les résultats de la détermination des acides fixes et volatils (1); j'y mentionne aussi si oui ou non il y a eu dégagement apparent de  $\text{CO}^2$ .

(1) Pour la détermination des acides volatils, j'ai tenu compte du fait que par la distillation se trouve entraîné de l'acide lactique en petite quantité proportionnelle à la concentration dans la culture: j'ai fait les corrections

TABLEAU VII.

ESPÈCES DE MICROBES	ACIDITÉ DANS DU MOÛT A 10° BALLING APRÈS 30 JOURS A 30°				PRODUCTION apparente de CO <sup>2</sup>
	Totale	Fixe	Volatile	Volatile, p. 100 d'acidité totale	
I	12,3	12,1	0,2	1,67 p. 100	0
II	9,4	7,9	1,2	13,2 —	(+) lente.
III	14,4	14,4	0	0	0
IV	19,25	12,05	7,1	36,9 —	(+) forte.
V	12,4	12,2	0,2	1,61 —	0
VI	17,2	4,5	6,2	36,0 —	(+) forte.
VII	8,5	7,39	1,11	13,0 —	+
VIII	8,6	7,0	1,1	12,8 —	+
IX	12,8	12,55	0,25	1,95 —	0
X	10,4	9,2	1,2	11,5 —	+
XI	11,0	9,5	1,5	13,6 —	+
XII	10,2	9,08	1,12	11,0 —	+
XIII	9,5	8,25	1,25	13,1 —	+
XIV	5,5	5,35	0,15	2,7 —	0
XV	6,7	2,56	4,14	61,8 —	+
<i>Lactob. del-</i> <i>brucki.</i> . .	11,3	11,3	0	0	0
<i>Lactob. fer-</i> <i>mentum.</i> . .	7,8	6,99	0,81	10,4 —	(+) rapide à 37°.
<i>Lb. pastor.</i> .	8,1	7,36	0,74	9,13 —	(+) lente.
<i>Lb. cer.</i> . .	8,75	8,09	0,66	7,45 —	(+) lente.
<i>Lactoc. dex-</i> <i>tranicus.</i> . .	6,6	5,49	0,11	16,8 —	+
<i>Streptococ.</i> <i>terric.</i> . .	3,53	3,53	0	0	0

Il résulte du tableau VII que la production d'acidité volatile est très variable avec l'espèce et que le nombre d'espèces n'en provoquant pas une trace est très limité.

### III. Action des microbes lactiques sur différents sucres; nature de leurs produits.

En général, on pourrait dire que les sucres glucose, lévulose, maltose et saccharose subissent, par une même espèce déter-

d'après les données obtenues par la distillation de solution d'acide lactique de différentes concentrations correspondant approximativement à celles de mes cultures en cet acide.

minée de microbe lactique et dans les mêmes conditions de culture, une acidification peu différente pour chacun d'eux; une dextrine donnant une coloration brune avec l'iode fournit une acidité moindre. L'intensité de l'acidification est variable

TABLEAU VIII.

ESPÈCES	ACIDITÉ APRÈS 26 JOURS A 30° DANS EAU DE LEVURE					ACIDITÉ APRÈS 26 JOURS A 30° dans le lait
	5 p. 100 glu- cose	5 p. 100 levu- lose	5 p. 100 mal- tose	5 p. 100 saccha- rose	5 p. 100 dex- trine	
I	10,6	11,7	11,0	11,9	11,4	14,9 solidifié.
II	12,1	13,5	7,2	11,9	13,5	15,1 solidifié.
III	14,2	16,9	13,5	16,2	5,9	2,3 fluide.
IV	13,5	14,4	13,5	13,0	9,9	—
V	13,1	13,1	14,0	12,2	10,8	9,2 épais.
VI	18,0	—	18,3	14,6	5,4	5,2 légèrement épais.
VII	11,7	12,8	13,5	13,2	5,6	3,8 fluide.
VIII	11,2	12,6	13,5	11,4	5,6	4,0 fluide.
IX	13,5	12,3	13,9	12,2	10,1	8,3 épais.
X	12,1	14,1	14,1	13,5	6,7	6,2 ± épais.
XI	16,2	13,5	15,7	13,7	4,7	3,4 fluide.
XII	13,9	12,6	14,8	14,9	4,1	5,4 ± épais.
XIII	2,6	7,4	14,6	—	3,0	fluide.
<i>Lactob. cer.</i> . . . . .	—	7,2	—	3,0	—	Id.
<i>Lactob. past.</i> . . . . .	—	4,8	—	3,0	—	Id.
<i>Lactoc. dextranicus</i> . . .	6,9	15,0	6,8	11,4	—	Id.

avec l'espèce de microbe. Au tableau VIII, je signale les doses d'acidité accusées par des cultures dans des solutions de 5 p. 100 de différents sucres dans de l'eau de levure et dans du lait.

On voit par le tableau VIII que quelques espèces montrent cependant une prédilection pour certains des sucres cités plus



haut. La conduite des microbes lactiques vis-à-vis du lait attire ici surtout notre attention ; en effet tandis que certaines espèces, appartenant spécialement au groupe des *floconneux par congglomération*, acidifient la lactose du lait comme ils le font du moût et des autres sucres cités, d'autres l'acidifient seulement faiblement et d'autres encore quasi pas. Comme complément au tableau VIII j'ajoute encore que le *Lactob. fer-*

TABLEAU IX.

ESPÈCES	ACIDITÉ DANS DE L'EAU	
	LEVURE	LEVURE + 30/0 LACTOSE
Contrôle.	1,1	1,1
I	1,8	10,7
III	1,6	1,2
IV	1,2	2,0
V	1,9	9,8
VI	1,15	2,25
VII	1,4	1,4
IX	1,9	9,35
X	1,2	1,0
XI	1,3	1,4
XIII	1,35	1,0
XIV	1,6	1,4
<i>Lactob. fermentum</i> . . . . .	1,1	5,5
<i>Lactob. delbrucki</i> . . . . .	1,25	4,9
<i>Lactob. cer.</i> . . . . .	1,0	1,25
<i>Lactob. pastorianum</i> . . . . .	1,1	1,2
<i>Lactococcus dextranicus.</i> . . . .	—	1,5

*mentum* et le *Lactob. delbrucki* ne se développent que peu dans le lait.

Ce fait de moindre activité ou d'inactivité d'espèces déterminées vis-à-vis du lait a été attribué à plusieurs reprises, entre autres par Smit, à une composition azotée du lait ne convenant pas au développement de ces espèces (1). Je montre par le tableau IX que cette explication est erronée pour les microbes lactiques en général et que la conduite différente

(1) Cette façon de voir pourrait être vraie jusqu'à un certain point pour le *Lb. fermentum* et *Lb. delbrucki* qui paraissent se développer un peu mieux dans l'eau de levure additionnée de lactose que dans le lait (V. tableau IX).

de certaines espèces vis-à-vis du lait et vis-à-vis de milieux nutritifs à base d'autres sucres (glucose, lévulose, maltose, saccharose) que le lactose, résulte d'une action différente et spécifique de ces espèces vis-à-vis du sucre lactose.

J'ai ensemencé respectivement une série d'espèces dans l'eau de levure additionnée de 3 p. 100 de lactose. Les expériences furent faites à 30° et les cultures titrées après 5 jours.

Dans tous les cas l'acidification a été proportionnelle au développement de l'espèce de microbe. On peut remarquer que l'acidification du lait par toutes les espèces de microbes lactiques a été analogue à celle provoquée respectivement par elles dans de l'eau de levure additionnée de 3 p. 100 de lactose.

J'ai aussi examiné si les microbes lactiques sont capables d'acidifier l'amidon et l'inuline. Ils ne possèdent ni amylase ni inulinase et ne peuvent dès lors saccharifier ces substances. L'inuline se saccharifie facilement par de petites doses d'acide, notamment d'acide lactique à une température encore relativement basse; ainsi de l'eau additionnée de 5 p. 100 d'inuline et de 4 c.c. 4 N. d'acide lactique par 100 cent. cubes réduit notablement la liqueur de Fehling après 6 jours de séjour à 30°; 8 c.c. 8 N. d'acide lactique par 100 cent. cubes donnent lieu dans les mêmes conditions et après le même temps à une forte saccharification.

Ce phénomène se produit de la même façon dans l'eau de levure que dans l'eau, mais un peu plus lentement. Ces faits nous font voir que, dans des milieux nutritifs modérément acides et contenant de l'inuline, cette dernière pourra subir la saccharification et successivement l'acidification dans le cas de présence de microbes lactiques. J'ai en effet remarqué que différentes espèces de microbes lactiques capables de provoquer une certaine acidité aux dépens de traces de sucre, qui se trouvent probablement dans l'eau de levure, finissent par provoquer dans des cultures d'eau de levure contenant 5 p. 100 d'inuline une dose d'acide parfois notable.

La saccharification de l'amidon par l'acide lactique est beaucoup plus difficile que celle de l'inuline et je n'ai jamais pu la constater dans les cultures de microbes lactiques.

PRODUITS DE LA FERMENTATION LACTIQUE. — Les *microbes lac-*

*tiques vrais* produisent aux dépens de tout sucre, acidifiable par eux, exclusivement de l'acide lactique.

*Les microbes lactiques producteurs de CO<sup>2</sup>* provoquent, d'après les travaux cités plus haut, de l'acide lactique en quantité dominante dans l'acidité totale, un peu d'acide succinique, de l'acide acétique, des traces d'acide formique, de l'alcool éthylique, du CO<sup>2</sup> et de la glycérine. Dans certains cas Smit aurait identifié des traces d'acétone et d'aldéhyde.

Pour une même espèce de bactérie lactique les produits restent qualitativement les mêmes pour tous les sucres acidifiables excepté pour le lévulose. Aux dépens de ce dernier il se forme, en outre des produits cités ci-dessus, encore de la mannite; la dose d'acide volatil devient notablement plus forte que pour les autres sucres et, pour certaines espèces de microbes lactiques, l'acidité volatile peut arriver à dépasser l'acidité fixe; les données de Gayon et Dubourg [2], Mazé et Pacottet, Müller-Thurgau et Osterwalder et Smit nous montrent que les quantités d'alcool et de glycérine diminuent au contraire avec la formation de mannite. Pour mieux fixer les idées je communique ici un tableau X extrait du travail de Smit (qui a analysé les produits d'action du *Lactob. fermentum* Beijerinck sur différents sucres). Les milieux furent additionnés d'un excès de CaCO<sup>3</sup> afin de neutraliser l'acidité au fur et à mesure de sa production et ainsi de permettre un développement continu du microbe et dès lors une acidification complète du sucre. Les cultures analysées furent faites dans de l'eau de levure additionnée respectivement de 5 p. 100 de glucose, de lévulose et de saccharose.

On peut remarquer que les produits pour le saccharose sont pour ainsi dire qualitativement intermédiaires entre ceux du glucose et du lévulose, ce qui prouve que dans ce cas le saccharose a subi l'inversion préalable à l'acidification; le sucre interverti donne également lieu à la production de mannite.

#### IV. *Phénomènes de réduction par les microbes lactiques.*

Le pouvoir réducteur appartient à la plupart des microbes dans une mesure variable d'après les espèces, même les bacté-

ries acétiques (d'après Söhlgen), connues comme des oxydants énergiques, peuvent opérer des réductions.

J'ai examiné le caractère réducteur des microbes lactiques vis-à-vis : 1° des sélénites et tellurates ; 2° de la formation de  $H^2S$  aux dépens du S ; 3° de la réduction du bleu de méthylène ; 4° du sucre lévulose.

1° ACTION RÉDUCTRICE VIS-A-VIS DES SÉLÉNITES ET TELLURATES. — Tous les microbes lactiques réduisent les sélénites et tellurates de sodium. L'examen eut lieu en faisant des cultures en stries sur du moût gélosé contenant respectivement 1 p. 1.000 de  $Na^2SeO^3$  et  $Na^2TeO^4$ . Le développement sur le milieu sélénité était extraordinairement rapide pour l'espèce XIV, bon pour VII et X, assez bon pour V et XI, faible pour III, IV, XIII et

TABLEAU X.

PRODUITS	GLUCOSE	LÉVULOSE	SACCHAROSE
$CO^2$ . . . . .	14,4 p. 100	"	17,4 p. 100
Alcool . . . . .	16,9 —	1,6 p. 100	16,8 —
Acide lactique . . . . .	47,1 —	12,3 —	33,7 —
— acétique . . . . .	3,7 —	12,9 —	6,1 —
— formique . . . . .	0,4 —	0,2 —	0,4 —
— succinique . . . . .	1,2 —	1,4 —	0,9 —
Mannite . . . . .	0 —	60,1 —	22,8 —
Glycérine . . . . .	6,3 —	0 —	0 —
Matériel microbien . . . . .	3,5 —	"	1,7 —
	92,9 p. 100	88,5 p. 100	100,5 p. 100

*Lactob. pastor.*, nul pour *Lactob. fermentum* et *Lactococcus dextranicus*. La réduction se manifeste par la coloration rouge des colonies dû au fait qu'à l'intérieur des cellules le sélénite est réduit en sélénium (rouge). Pour les espèces qui n'ont pas donné assez de développement pour bien juger si oui ou non il y a eu réduction, j'ai amené sur le milieu sélénité du matériel bactérien cultivé sur du moût gélosé non sélénité où toutes les cultures avaient été très bonnes.

Sur le moût telluré le développement ne se fit qu'en traces, et pour quelques espèces seulement, ce qui prouve que la nocivité des sels de tellure est encore plus grande que celle des sels



de sélénium. Du matériel bactérien amené sur le moût telluré, comme dans le cas précédent, manifestait la réduction du tellurate en tellure par sa coloration en noir.

2° FORMATION DE  $H^2S$  EN PRÉSENCE DU SOUFRE. — Une série de microbes lactiques futensemencée dans du moût à 10° B. dans des flacons de 100 cent. cubes remplis à moitié. Après que le développement se fut suffisamment fait à 30°, c'est-à-dire après 24 heures environ, j'ai ajouté à chaque culture une pincée de soufre en fleur (1) et attaché dans le col du flacon une bandelette de papier à l'acétate de plomb. Après un temps variable pour chaque espèce le papier de presque tous les essais se colore plus ou moins fortement. La coloration se constate déjà après quelques heures pour IV, VI et le *Lactob. fermentum*. Je mentionne ci-après le degré de noircissement approximatif du papier à l'acétate de plomb ; pour chaque espèce de microbe examiné, après 2 jours de culture à la température de 30°.

Moût sans addition de S (contrôle) . . . . .	Aucune coloration.
Moût + S (contrôle). . . . .	—
Moût sans Sensemencé respectivement de chaque espèce de microbe lactique (contrôle) . .	—
Culture I + S. . .	Légère coloration noirâtre.
— III + S. . .	Aucune coloration ni après 2 ni après 8 jours, quoique le développement de la culture fût très fort.
— IV . . . . .	Noircissement rapide et intense.
— V . . . . .	Légère coloration.
— VI . . . . .	Noircissement rapide et intense.
<i>Lactobac. fermentum</i> ,	
VII VIII, XI . . . . .	— notable.
<i>Lactob. past.</i> et <i>Lactob. dextranicus</i> .	— Noircissement modéré.

Ces expériences montrent que la plupart des espèces de microbes lactiques sont capables de transformer le S en  $H^2S$ . Ce fait nous apprend de plus que des espèces du groupe des microbes lactiques réducteurs peuvent donner lieu à la production de l'« odeur de bouc » dans le vin, au même titre que la levure qui réduit aussi le S et les sulfites en  $H^2S$ .

3° RÉDUCTION DU LÉVULOSE. FERMENTATION MANNITIQUE. — Mes résultats me permettent de me rallier à la façon de voir de Smit

(1) J'ai remarqué que l'addition du soufre, au moment de l'ensemencement, empêche ou retarde le développement de certaines espèces.

qui établit que seules les espèces de microbes lactiques productrices de  $\text{CO}_2$  sont capables de provoquer la fermentation mannitique. Mes expériences furent faites en ensemençant chacune des espèces à examiner dans de l'eau de levure contenant 5 p. 100 de lévulose.

Produisent de la mannite : II — IV — VI — VII — VIII — X — XI — XII — XIII — XV — *Lactob. fermentum*, *Lactob. cer.*, *Lactob. past.*, *Lactococcus dextranicus*.

Ne produisent pas de mannite : I — III — V — IX — XIV.

Je montrerai bientôt que la quantité de mannite produite est proportionnelle à la production de  $\text{CO}_2$  et d'acide volatil.

4° RÉDUCTION DU BLEU DE MÉTHYLÈNE. — J'ai cru pouvoir démontrer par des expériences au moyen du bleu de méthylène

TABLEAU XI.

ESPÈCES EXAMINÉES	ACIDITÉ VOLATILE	BLEU DE MÉTHYLÈNE RÉDUIT (en milligr.)
Contrôle (moût non ensemen- cé). . . . .	0	2
I . . . . .	0,4	8
III . . . . .	0	3
IV . . . . .	4,7	202
VI . . . . .	4,62	193
VII . . . . .	1,2	50
XI . . . . .	1,3	42
XIII . . . . .	1,15	48
<i>Lactob. cer.</i> . . . . .	0,6	25
<i>Lactob. fermentum</i> . . . . .	2,65	91

lène ce à quoi j'ai déjà fait allusion ci-dessus et ce dont me donnèrent l'impression tous mes essais de réduction précédents, notamment qu'il existe un rapport constant entre le pouvoir réducteur d'une espèce de microbe lactique et la dose d'acide volatil et la dose de  $\text{CO}_2$  qu'elle produit aux dépens des sucres. Une série de microbes lactiques futensemencée respectivement dans du moût de 10° B. dans des bouteilles de 60 cent. cubes à bouchons à l'émeri, complètement remplies afin d'éviter autant que possible le contact de l'air donnant lieu à la réoxydation du bleu de méthylène réduit.

Le bleu de méthylène est ajouté aux cultures au fur et à mesure de la décoloration; la quantité réduite se trouve exprimée en milligrammes dans le tableau XI; l'acidité volatile a été déterminée au moment de la décoloration du bleu de méthylène de la dernière addition.

Si ces chiffres n'accusent pas pour chaque espèce une proportionnalité exacte entre l'acidité volatile et la quantité de bleu de méthylène réduit, cela doit être attribué aux causes d'erreur que présente cette expérience grossière et qui sont principalement : 1° pendant la fermentation une partie de la culture se perd entraînée par le dégagement de  $\text{CO}_2$  et d'autant plus grande que la production de  $\text{CO}_2$  est plus forte et plus rapide; 2° le contact de l'air qui est inévitable pendant l'addition répétée de bleu de méthylène, donne lieu à une réoxydation d'une partie de bleu de méthylène réduit.

D'autre part la proportionnalité entre l'acidité volatile et la quantité de  $\text{CO}_2$  dégagée paraît si manifeste déjà aux constatations superficielles (voir tableau VII) que je n'ai fait des essais rigoureux que pour 2 espèces, IV et VI, les deux qui jouissent du pouvoir producteur de  $\text{CO}_2$  et d'acide volatil le plus intense. Après 13 jours de culture à 30° dans du moût à 10° B., elles avaient produit

	ACIDITÉ VOLATILE	$\text{CO}_2$ à 15°	$\text{CO}_2$ en gr.
IV . . . . .	8,55	414 c. c.	(0 gr. 760)
VI . . . . .	7,2	355 c. c.	(0 gr. 650)

La comparaison des deux expériences nous conduit pour les deux ferments aux mêmes proportions d'acide volatil et de  $\text{CO}_2$ .

Ce qui précède nous montre que, vis-à-vis de S, du bleu de méthylène et du sucre lévulose, les microbes lactiques peuvent se distinguer en *réducteurs* et *non réducteurs*.

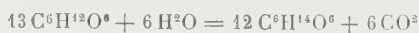
Tous ces faits de réduction établis, il faut se demander quelle peut être la *nature de la réduction*. La première hypothèse qui se présente à l'esprit est celle de la possibilité de production d'hydrogène libre par les microbes lactiques réducteurs, lequel hydrogène opérerait la réduction sous l'action catalytique du microbe; cette hypothèse doit être écartée, car les microbes lactiques ne produisent pas d'hydrogène libre; pour m'en

convaincre, j'ai opéré sur de grands volumes de gaz et mes résultats ne font que confirmer une fois de plus ce qui a été établi à différentes reprises, notamment par Gayon et Dubourg, Beijerinck [3], Henneberg [4], Müller-Thurgau et Smit.

Spécialement pour la fermentation mannitique plusieurs réactions ont été proposées. Celle de Pasteur



n'est pas exacte puisque la production de la mannite est indépendante de la formation de matière visqueuse. La réaction de Duclaux



en apparence plus admissible ne résiste pas non plus à l'examen approfondi. La plupart des auteurs lui ont reconnu l'avantage de tenir compte de la production simultanée de mannite et de  $\text{CO}^2$ , produits dont ils croyaient la formation inséparable dans la fermentation mannitique. Cette façon de voir, encore exprimée dans les derniers temps par Müller-Thurgau et Smit, est inexacte; la production de mannite se fait indépendamment de celle de  $\text{CO}^2$  comme le prouvent les expériences suivantes.

Ce qu'on peut dire est que la production de  $\text{CO}^2$  par un microbe lactique aux dépens d'un sucre indique que cette espèce est réductrice et la mesure de  $\text{CO}^2$  dégagé fournit la mesure de son pouvoir réducteur dans le milieu employé.

Des expériences m'ayant appris que le pouvoir réducteur persiste dans les cultures de microbes lactiques réducteurs, après la fermentation (1), je disposais du moyen de séparer la fermentation lactique proprement dite, l'acidification, de la fermentation mannitique.

Du moût à 10° B.ensemencé par l'espèce IV fut laissé à la température de 30° jusqu'à la formation du maximum d'acidité correspondant au moment où le dégagement de  $\text{CO}^2$  est devenu nul. Je considérais ce moment comme venu après vingt-huit

(1) Ce fait par lui seul est déjà suffisant pour prouver que la réduction ne peut être due à de l'hydrogène libre puisque l'échappement de ce dernier, devrait inévitablement avoir comme conséquence la disparition du pouvoir réducteur de la culture.



jours, l'acidité totale de la culture était alors de 20 c.c. 5 N p. 100. De cette culture, agitée, fut remplie une bouteille stérile de 60 cent. cubes dans laquelle fut ajouté 5 p. 100 de sucre lévulose et qui fut placée à 30°. Après vingt-quatre heures, l'évaporation d'une partie du liquide laissa dans le résidu une forte cristallisation de mannite. Parallèlement à cette expérience je fis des essais comparatifs avec le soufre et le bleu de méthylène, dont les résultats montrèrent aussi un pouvoir réducteur prononcé et rapide de la culture acidifiée : 60 cent. cubes de cette culture purent réduire 150 milligrammes de bleu de méthylène en vingt-quatre heures à 30°. Pendant ces réductions intenses il ne s'est *pas dégagé une trace de CO<sup>2</sup>*.

On comprendra que la condition essentielle de ces expériences consiste à supprimer le pouvoir acidifiant et en même temps le pouvoir producteur de CO<sup>2</sup> du microbe lactique et à lui garder seul son facteur réducteur, sinon, spécialement pour le lévulose, il pourrait se faire une nouvelle acidification accompagnée inévitablement d'un dégagement de CO<sup>2</sup>. J'ai réalisé cette condition en laissant s'épuiser le pouvoir acidifiant du matériel microbien par une acidification préalable; d'autre part, l'acidité élevée du milieu devait empêcher une nouvelle multiplication du microbe.

Par d'autres recherches, j'ai tâché de me renseigner de plus près sur la *nature de l'agent réducteur*.

Dans 60 cent. cubes de moult acidifié clair obtenu par décantation du liquide clair surnageant d'une culture acidifiée d'une part, et dans 60 cent. cubes de culture trouble (contenant donc du matériel microbien) d'autre part, j'ai ajouté primitivement 10 milligrammes de bleu de méthylène.

Après vingt-quatre heures la réduction était nulle dans le liquide exempt de corpuscules microbiens alors que le même liquide, mais contenant le matériel microbien, avait réduit 150 milligrammes de bleu de méthylène. Les expériences de réduction du lévulose et du soufre donnèrent dans les mêmes conditions des résultats analogues.

La même culture trouble ne donne plus de réduction après ébullition.

Ces différents faits établissent que la réduction ne peut se faire qu'en présence du corps microbien ayant conservé son

activité enzymatique et doit être attribuée à l'action d'une endo-enzyme que je désignerai sous le nom de *lévulo-mannitase*.

Une preuve que l'enzyme réductrice devait être une endo-enzyme se trouvait déjà dans le fait que la coloration obtenue par la réduction des sélénite et tellurate de sodium se limitait aux colonies microbiennes sans se produire en dehors de celles-ci.

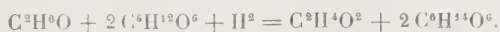
Une nouvelle question s'impose : La réduction se fait-elle dans la cellule directement aux dépens de la substance réductible ou bien se fait-elle aux dépens de certains produits de la fermentation lactique en solution dans la culture, sous l'influence de la *lévulo-mannitase* comme catalyseur ? Pour pouvoir répondre à cette question j'ai décanté le liquide clair d'une culture de l'espèce IV dans du moût ayant atteint son acidité finale ; j'ai lavé le matériel microbien à plusieurs reprises à l'eau distillée, jusqu'à réaction neutre, pour le priver de tous les produits de la fermentation lactique. Ce matériel microbien ainsi lavé fut mis en suspension dans un peu d'eau distillée et additionnée, pour des essais respectifs, de lévulose, de soufre et de bleu de méthylène. La réduction se fit, mais moins intense que dans la culture même, ce qui prouve que la réduction peut se faire par la réductase directement aux dépens de la substance réductible ajoutée.

A la suite de ces constatations il semble logique d'exprimer la fermentation mannitique par :



Je n'ose cependant considérer cette réaction comme indubitablement définitive, car elle ne fournit pas l'explication du fait signalé plus haut, notamment de la production d'une plus grande dose d'acide volatil aux dépens du lévulose qu'aux dépens des autres sucres.

En 1903, Mazé et Perrier ont voulu attribuer ce surplus d'acide volatil à l'oxydation de l'alcool en acide acétique avec production simultanée de mannite suivant la réaction suivante :



Les auteurs attribuaient cette oxydation à une action enzyma-

tique. Leur hypothèse trouve un appui dans les recherches de Gayon [1] et Dubourg, Müller-Thurgau et Osterwalder et Smit qui établirent que les ferments mannitiques produisent notablement plus d'acide acétique aux dépens du lévulose qu'aux dépens des autres sucres, mais en même temps peu ou pas d'alcool et de glycérine, alors que la quantité de  $\text{CO}_2$  reste la même (voir tableau X). Des expériences m'ont convaincu qu'il ne faut pas chercher la provenance du surplus d'acide acétique dans une transformation de l'acide lactique en acide acétique par les microbes lactiques réducteurs.

V. Action des microbes lactiques sur la mannite, sur le lactate et le malate de calcium.

En même temps j'ai soumis à l'examen la mannite, le lactate de calcium, produits de la fermentation lactique, et le malate

TABLEAU XII.

ESPÈCES	ACIDITÉ APRÈS 5 JOURS A 30°			
	EAU DE LEVURE	EAU DE LEVURE		
		3 p. 100 mannite	3 p. 100 lactate de Ca	3 p. 100 malate de Ca
Contrôle	1,1	1,0	1,3	1,4
I	1,8	7,35	1,8	1,2
III	1,6	5,1	1,8	1,1
IV	1,2	2,3	1,65	1,5
V	1,9	7,5	1,9	—
VI	1,45	2,3	1,5	1,4
VII	1,4	1,6	1,6	—
IX	1,9	7,2	1,9	—
X	1,2	1,45	1,2	—
XI	1,3	1,5	1,65	1,0
XIII	1,35	1,9	1,2	0,65
XIV	1,6	1,2	1,5	0,75
<i>Lactob. fermentum</i> . . .	1,1	1,3	1,4	—
— <i>delbrucki</i> . . . .	1,25	1,7	1,5	—
— <i>cer.</i> . . . . .	1,0	1,0	1,4	—
— <i>past.</i> . . . . .	1,1	1,0	1,3	0,8
<i>Lactococ. dextranicus</i> . .	—	2,0	1,55	—

de calcium. A de l'eau de levure fut ajouté respectivement 3 p. 100 de chacune de ces substances, chacun des

milieu fut ensemencé avec une série de microbes lactiques différents; le titrage de l'acidité eut lieu après cinq jours de culture à 30° (voir tableau XII).

1° La mannite est attaquée par le groupe des *microbes lactiques floconneux* et parmi eux *spécialement par les espèces non productrices de CO<sup>2</sup>* ou *non réductrices* qui donnent à ses dépens un développement et une acidification notable; les espèces IV et VI provoquent une légère acidification; l'action manifestée par les autres espèces est négligeable ou nulle. Je fais cependant remarquer que XIII rend le liquide légèrement visqueux. On pourrait dire que les producteurs de mannite ne l'attaquent pas, ce qui est en concordance avec les observations de tous les auteurs qui se sont occupés de la fermentation mannitique. Les microbes lactiques de la bière ne donnent aucun développement aux dépens de la mannite; il est probable que les constatations contradictoires de Henneberg <sup>1</sup> concernant le *Saccharob. pastorianus* Van Laer (*Lb. past.*) et le *B. fasciformis* Rommel et Schönfeld reposent sur une erreur;

2° Le lactate de calcium n'est attaqué par aucune espèce de microbe lactique;

3° Quelques espèces donnent un très léger développement aux dépens du malate de calcium.

#### VI. Action des microbes lactiques sur les glucosides.

Sous le nom de « réactions de l'émulsine », Beijerinck [4] a décrit l'action décomposante de certains microbes lactiques vis-à-vis des glucosides esculine, indican et amygdaline.

L'action sur l'esculine fut examinée pour une série d'espèces par leur culture sur les milieux suivants :

α. Eau de levure gélosée. . . . .	100,0
Glucose . . . . .	5,0
Esculine. . . . .	0,1
Citrate de fer . . . . .	0,1
β) Le même milieu sans addition de glucose.	

Dans le cas de décomposition, l'esculine produit du glucose et de l'esculétine ( $C^{15}H^{16}O^9 + H^2O = C^8H^{12}O^6 + C^7H^4O^4$ ); cette dernière fournit en présence du citrate ferrique une coloration brune ou noirâtre d'après la réaction du milieu.



Décomposent l'esculine : I — V — VI — IX — X — XII — XIII.

Ne décomposent pas l'esculine : II — III — IV — VII — VIII — XI — XIV.

Les espèces I — V — IX et X sont les plus actives.

L'expérience, répétée après un an de conservation en culture pure des espèces citées, donnait encore les mêmes résultats.

Je veux mentionner en passant que des essais comparatifs m'ont montré que les levures haute et basse de brasserie, la levure de distillerie, une levure de vin (bordeaux) donnaient lieu à une décomposition énergique de l'esculine ; le *Schizos. pombe* et le *S. apiculatus* opèrent plus lentement ; la levure de bière autolysée et l'extrait suivant le procédé Lebedeff produisent aussi la réaction ; le *B. coli* reste inactif.

Je fais remarquer que la réaction se manifeste beaucoup plus rapidement et plus intensément pour le milieu ( $\beta$ ) exempt de sucre. Il faut sans doute attribuer ce fait à ce que dans le milieu ( $\alpha$ ) la décomposition de l'esculine se trouve gênée par la présence du glucose, alors que dans le milieu ( $\beta$ ) le glucose produit est consommé par la bactérie au fur et à mesure de sa production.

Les espèces de microbes lactiques examinées se comportèrent de même vis-à-vis de l'indican. L'amygdaline, au contraire, ne fut décomposée par aucune d'elles.

#### VII. Influence des microbes lactiques sur la fermentation alcoolique.

Toutes les espèces de microbes lactiques sont nuisibles pour la levure. Cette nocivité doit être attribuée à l'acidité produite par les ferments lactiques ou au fait que certaines espèces de microbes lactiques jouissent de la propriété d'agglutiner la levure ou, pour certaines espèces, à ces deux raisons à la fois.

En effet, M. et M<sup>me</sup> Rosenblatt, avec Kayser et Dumas, ont montré qu'à aucune dose les acides libres ne favorisent la levure alcoolique.

L'acide lactique peut être supporté par la levure jusqu'à dose élevée sans qu'il arrête la fermentation, mais de petites quantités de cet acide diminuent sensiblement déjà la multiplication de la levure. Une espèce de levure haute produisant après sept jours à la température de 20° une atténuation de 86 p. 100 dans

du moût ne donnait, dans le même moût, et après sept jours aussi, qu'une atténuation de 72 p. 100, pour une addition de 13 c. c. 2 N p. 100 d'acide lactique et 60 p. 100 pour une addition de 25 c. c. 6 N p. 100 d'acide lactique.

Les acides volatils de la fermentation lactique sont beaucoup plus nuisibles que l'acide lactique.

Je ne citerai ici que les chiffres fournis par Johannessohn

TABLEAU XIII.

ESPÈCES EXAMINÉES	ATTÉNUATION apparente	ACIDITÉ	REMARQUES
Levure haute pure. . . . .	84 p. 100	2,2	—
— + I. . . . .	73 —	7,7	Agglutination de la levure. Culture parfaitement claire.
— + III. . . . .	76 —	6,4	Pas d'agglutination de la levure.
— + IV. . . . .	77 —	4,0	Id.
— + V. . . . .	75 —	6,2	Id.
— + VI. . . . .	78 —	3,9	Id.
— + XI. . . . .	69 —	9,5	Agglutination de la levure. — Culture plus trouble.
— + XIII. . . . .	53 —	8,4	Production de matière visqueuse et agglutination de la levure.
— + <i>Lb. fermentum</i> . . . . .	81 —	2,2	Le <i>Lb. fermentum</i> ne s'est pas développé.

parce que mes conclusions résultant des expériences mentionnées au tableau XIII se rapprochent des résultats de cet auteur.

Il établit que la fermentation alcoolique est entravée respectivement par 0 gr. 092 p. 100 d'acide formique et 0 gr. 5 p. 100 d'acide acétique; comme doses les plus faibles déjà nuisibles il admet 0 gr. 032 p. 100 pour l'acide formique et 0 gr. 12 p. 100 pour l'acide acétique.

En partant de ces données, on pourrait croire qu'un coup d'œil sur le tableau VII nous permet de classer les microbes lactiques suivant leur nocivité. Ceci serait vrai si le développement de chaque espèce se faisait avec la même intensité en présence de la levure qu'en culture pure, ce qui n'est pas le

cas. C'est pourquoi il est nécessaire d'examiner chaque espèce de microbe lactique en la cultivant simultanément avec de la levure avant de se prononcer sur sa nocivité. L'influence défavorable pour chaque espèce est variable avec les conditions de culture. Les expériences du tableau XIII en fournissent la preuve. J'aiensemencé dans du moût à 40° B. simultanément une trace de levure haute pure avec plusieurs espèces de microbes lactiques respectivement; après quatre jours de culture à la température de 30°, j'ai déterminé en même temps l'atténuation apparente et l'acidité du milieu.

D'après le tableau VII, les espèces IV et VI, produisant la plus grande dose d'acidité volatil et étant, en culture pure, les acidificateurs les plus énergiques, devraient se montrer les plus nocifs à l'égard de la levure; on voit que ceci n'est pas le cas, du moins lors de l'ensemencement simultané du microbe et de la levure. Ce fait provient de ce que IV et VI se trouvent gênées par le développement et l'action de la levure et que dès lors leur multiplication et l'acidification sont très lentes. D'autres espèces, au contraire, telles que principalement XI et XIII qui en culture pure acidifient moins rapidement que IV et VI et produisent beaucoup moins d'acide volatil, paraissent non gênées mais plutôt favorisées par la levure, provoquent une acidification rapide et se montrent les plus nocives.

Je puis déduire de ces essais ce que nous ont déjà appris les données préliminaires sur l'action des acides sur la levure, notamment : 1° que *parmi les microbes lactiques vrais* (ceux ne produisant pas d'acide volatil) *les plus nuisibles sont ceux qui forment le plus d'acide lactique à côté de la levure*; 2° que *l'atténuation est d'autant plus faible qu'il se forme dans le milieu plus d'acide volatil*.

Il est évident que, dans les mélanges d'acide lactique et d'acides volatils produits par les ferments lactiques, chacun de ces acides agit par sa nocivité spécifique.

Je fais remarquer que, dans chacun des deux groupes de microbes lactiques respectivement (non producteurs et producteurs d'acide volatils) ceux qui forment le plus d'acide en culture simultanée avec la levure et, par le fait même, qui sont les plus nuisibles, sont ceux qui agglutinent la levure (I — XI — XIII), ce qui prouve que l'agglutination par elle-même est

déjà défavorable. Ce n'est d'ailleurs pas inattendu, vu qu'il est établi que la levure à l'état divisé (« poussiéreuse ») a une énergie fermentative plus grande qu'à l'état congloméré (« floconneuse »), ce qui s'explique par le fait que dans le dernier cas la surface de contact de la levure avec le liquide à fermenter est moins grande. L'influence défavorable de cette diminution de surface se met encore mieux au jour pour

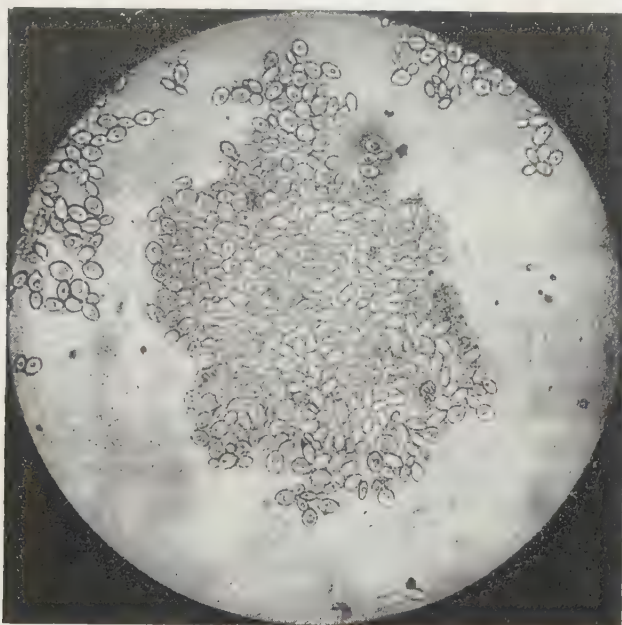


FIG. 3. — Agglutination des cellules de levure par le *Lactobacterium floccogenum*. Culture simultanée dans du moût. (Gr. : 325.)

l'espèce XIII où, en outre de la coagulation de la levure, a lieu la formation d'une matière visqueuse qui vraisemblablement enveloppe les paquets de cellules agglutinées.

L'atténuation obtenue avec XIII est notablement inférieure à celle avec XI qui produit cependant plus d'acide total et plus d'acide volatil que la première espèce.

L'AGGLUTINATION DE LA LEVURE PAR CERTAINES ESPÈCES DE MICROBES LACTIQUES (fig. 3). — Ce phénomène fut d'abord signalé par Barendrecht et étudié, pour une espèce de microbe lactique



agglutinante, *B. listeri*, par Henneberg. Beijerinck [4] a décrit une espèce semblable sous le nom de *Lactococcus agglutinans*.

J'ai dans ma collection 3 espèces différentes de microbes lactiques qui agglutinent la levure : l'espèce XI que je désigne par *Lactobacterium listeri* parce que j'estime qu'elle correspond au *B. listeri* Henneberg, l'espèce I que je propose d'appeler *Lactobacterium floccogenum* et l'espèce XIII que je propose d'appeler *Lactobacterium viscogenum*.

L'agglutination de la levure par les microbes lactiques agglutinants peut s'obtenir soit en cultivant ensemble la levure et le microbe lactique, soit en ajoutant à de la levure en culture liquide ou en suspension dans l'eau, goutte à goutte une culture fraîche de microbes agglutinant. La première méthode est la plus sûre et la seconde la plus simple et la plus rapide.

L'agglutination se produit en milieu acide, neutre et alcalin ; elle paraît favorisée par une certaine chaleur, 30° par exemple. Les flocons se désagrègent lentement dans les cultures conservées.

Les cellules de levure tuées par l'ébullition sont encore coagulables par une culture de microbe agglutinant ; l'ébullition de la culture du microbe au contraire supprime le pouvoir agglutinant, ce qui pourrait faire supposer une action enzymatique de la part du microbe agglutinant. Le professeur Beijerinck admet comme explication du mécanisme de l'agglutination que le microbe agglutinant produit en culture une matière visqueuse qui passe en suspension dans le liquide et enveloppe les cellules de levure d'une couche superficielle qui sert de matière de liaison entre les cellules de levure. Cette façon de voir est basée sur le fait que le filtrat clair d'une culture de l'espèce *Lactobacterium floccogenum* est encore capable d'agglutiner la levure et pourrait trouver un appui dans le fait que le *Lactobacterium viscogenum* produit de la matière visqueuse et peut agglutiner la levure.

#### D. — Chimie de la fermentation lactique.

Les différentes transformations opérées par les microbes lactiques doivent être attribuées à l'action d'enzymes endocel-

lulaires. Herzog a montré l'existence d'une *lacto-acidase* dans le *Bacterium acidi lactis*, de même que Hastings, Evans et Hart dans le *Bac. lactis acidi*, Buchner et Meisenheimer (1) mentionnent déjà avant l'intervention d'une pareille enzyme dans la production de l'acide lactique. D'après Weigmann les microbes lactiques desséchés conservent leur pouvoir acidifiant.

# I. — Action des microbes lactiques sur les hexoses.

1° Les microbes lactiques vrais transforment les hexoses, sous l'action d'une *lacto-acidase*, exclusivement en acide lactique :



2° Les microbes lactiques producteurs de  $CO^2$  donnent lieu à une série de produits dont la formation n'a encore pu être exprimée que par des réactions hypothétiques; je n'en citerai que quelques-unes, celles qui ne paraissent pas en discordance avec nos connaissances actuelles :

Pour la production de :

l'acide acétique . . . . .  $C^6H^{12}O^6 = 3 C^2H^4O^2$

l'alcool et  $CO^2$  (Duclaux) . . .  $C^6H^{12}O^6 = 2 C^2H^6O + CO^2$

de la glycérine (Duclaux) . . .  $7 C^6H^{12}O^6 + 6 H^2O = 12 C^3H^5O^3 + 6 CO^2$

l'acide succinique (Duclaux) . .  $7 C^6H^{12}O^6 + 6 CO^2 = 12 C^4H^6O^4 + 6 H^2O.$

Il faut admettre pour les microbes lactiques producteurs de  $CO^2$  une constitution enzymatique plus complexe que pour les microbes lactiques vrais. Je rappelle quelques faits établis plus haut : 1° que le rapport de la dose d'acide lactique, d'une part, à la somme de tous les autres produits de la fermentation lactique, d'autre part, est variable d'après l'espèce de ferment lactique ; 2° que, pour chaque espèce déterminée, ce rapport est variable d'après les conditions de culture (par exemple avec l'action de l'air) ; 3° que d'autre part il existe pour toutes les espèces de microbes lactiques un rapport constant entre l'acidité volatile, le pouvoir réducteur,  $CO^2$  et l'alcool, et probablement aussi la glycérine et l'acide succinique. Je crois pouvoir déduire de ces faits :

(1) BUCHNER et MEISENHEIMER : d'après MAZÉ et PERRIER [4].

1° Que la *production de l'acide lactique par les microbes producteurs de CO<sup>2</sup> se fait par une acido-lactase* (semblable à celle qui se trouve dans les microbes lactiques vrais) qui agit indépendamment de toutes les autres enzymes du protoplasme cellulaire ( $C^2H^4O^6 = 2 C^2H^3O^5$ ); ceci nous apprend qu'une réaction unique exprimant tous les produits de la fermentation lactique n'aurait aucun sens;

2° Que *tous les produits de la fermentation lactique, autres que l'acide lactique, pourraient s'exprimer par une seule réaction*, car à mon avis ils sont dus à l'action d'un complexe d'enzymes à action parallèle. Cependant je ne tâcherai pas en ce moment de traduire ma façon de voir en réaction, pour le bon motif que les proportions des différents produits entre eux ne sont pas encore assez exactement établies. En attendant plus de lumière à ce sujet on pourrait exprimer les transformations par quelques réactions simples, séparées, telles que celles citées plus haut et qui par leur ensemble pourraient constituer la réaction globale de tous les produits autres que l'acide lactique. Dans cette réaction les composantes de Duclaux pour la production de la glycérine et de l'acide succinique s'exprimeraient par



Je ne cite pas de réaction pour la production de l'acide formique dont le mécanisme est encore obscur; certains auteurs ont proposé à ce sujet des réactions admettant la production simultanée d'hydrogène libre dont la présence n'a pu être constatée.

## II. — *Action des microbes lactiques sur les polysaccharides.*

D'après la règle généralement admise, les polysaccharides devraient, pour devenir assimilables, subir par hydrolyse préalable la simplification jusqu'à la forme monosaccharide.

Un cas d'hydrolyse préalable du lactose en glucose galactose est mentionné par Bertrand et Weisweiller et par Bertrand et Duchacek pour le *Bacillus bulgaricus*. Le ferment mannitique de Gayon et Dubourg [2] ne contenait ni invertase, ni maltase, ni lactase; le *Saccharob. pastorianus* de Van Laer ne contenait, d'après l'auteur, aucune enzyme hydrolysant les

polysaccharides; le *Lactob. fermentum*, d'après Smit, ne contenait ni lactase, ni raffinase.

J'ai entrepris quelques expériences afin de me rendre compte de l'hydrolyse éventuelle des sucres maltose et saccharose par mes microbes lactiques.

1° RECHERCHE D'UNE MALTASE OU MALTO-GLUCASE. — Mes expériences furent basées sur le fait que certaines levures telles que le *S. apiculatus* Reess et le *Mycoderma* ne se développent pas aux dépens du maltose, mais bien aux dépens du glucose. Si les microbes lactiques contiennent de la malto-glucose, ils seront en état, par la décomposition de maltase en glucose, de rendre assimilable pour les levures citées ci-dessus un milieu maltosé.

a) *Par la méthode auxanographique de Beijerinck* [5]. — Dans de l'eau de levure gélosée contenant 5 p. 100 de maltose, chauffée à l'ébullition et refroidie rapidement vers 40° fut ajoutée une goutte d'eau stérile tenant en suspension des cellules de *Mycoderma cerevisiæ*; le tout est versé dans une boîte de culture. Après solidification je fis sur ce milieu des stries de cultures pures de 10 espèces différentes de microbes lactiques. Toutes se développèrent bien, mais la multiplication du *Mycoderma*, faible partout, fut la même autour des colonies de microbes lactiques que dans les intervalles espacés de ces colonies, ce qui prouve que des colonies de microbes lactiques il n'y a eu aucune diffusion de glucose. Des essais parallèles avec le *S. apiculatus* donnèrent lieu à la même conclusion.

b) *Dans de l'extrait de malt 10° B.* furentensemencés : dans un premier matras, le *S. apiculatus*; dans un 2° matras, le *S. apiculatus* et *Lactob. pastor.*; dans le 3° matras, le *S. apiculatus* et l'espèce III.

Les cultures furent placées à 20°; après 5 jours la densité était tombée dans les 3 milieux à 8°6 Balling, perte qui correspondit à la disparition du glucose du moût. Les microbes lactiques qui produisirent cependant un bon développement ne décomposèrent pas le maltose en glucose, sinon l'atténuation par le *S. apiculatus* aurait dû être plus forte pour les cultures contenant les microbes lactiques.



Les mêmes expériences dans l'eau de levure contenant 5 p. 100 de maltose donnèrent lieu à un bon développement des microbes lactiques et acidification par eux, mais non à la multiplication du *S. apiculatus*.

2° RECHERCHE DE L'INVERTASE. — J'aurais pu faire remarquer à la suite du tableau VIII que les milieux « eau de levure et 5 p. 100 saccharose » donnaient la réaction de Fehling pour les cultures de toutes les espèces de microbes lactiques au moment de la détermination de l'acidité, c'est-à-dire après un séjour de 26 jours à 32°.

Il serait imprudent de conclure de là à l'existence de sucrase, car l'expérience m'a prouvé que des quantités relativement faibles d'acide peuvent invertir le sucre saccharose. Ainsi, après 3 jours à la température de 30°, on obtient déjà une faible inversion dans de l'eau de levure contenant 5 p. 100 de saccharose et titrant une acidité de 6 cent. cubes N p. 100 en acide lactique; l'inversion est déjà notable pour une acidité de 9 à 12 cent. cubes N p. 100. Ces essais montrent que, pour éviter toute cause d'erreur, la recherche d'une enzyme invertissante doit se faire en dehors de l'influence des acides formés pendant la fermentation lactique, ce qu'on obtient en les neutralisant au fur et à mesure de leur production en ajoutant un excès de craie aux cultures. J'ai opéré suivant la méthode auxanographique sur de l'eau de levure gélosée contenant 5 p. 100 de saccharose + 1 p. 100 de  $\text{CaCO}_3$  dans laquelle avait étéensemencé dans toute la masse, dans un cas, le *S. apiculatus*, dans l'autre le *Mycoderma cerevisiae* et à la surface de laquelle furent ensemencées en stries les différentes espèces de microbes lactiques; il est connu que ni le *S. apiculatus* ni le *Mycoderma* ne se développent aux dépens du saccharose, mais bien aux dépens du sucre interverti.

Après 2 jours à 30° les deux espèces de levures s'étaient bien développées dans et autour du champ de culture des espèces I — III — IV — V — VI — IX et *Lactoc. dextranicus* mais ni dans le champ, ni autour du champ de culture des espèces VII — VIII — X — XI — XII — XIII — XIV — *Lactob. pastor.*, d'où résulte que les espèces de la première série (espèces floconneuses) contiennent de l'invertase, qui manque dans celles

de la deuxième série (espèces non floconneuses). L'addition d'un peu d'acide lactique au milieu précédent donna lieu à une légère trace de développement du *Mycoderma* et du *S. apiculatus*. Les microbes lactiques dépourvus d'invertase acidifient cependant le saccharose de la même façon que ceux qui en possèdent.

Ces résultats démontrent que le saccharose, pour une partie des espèces de microbes lactiques, et le maltose pour toutes les espèces subissent l'assimilation et l'acidification sans hydrolyse préalable; il en résulte que la nécessité de la décomposition préalable des polysaccharides en mono-saccharides ne peut être admise comme un principe général. Il est vrai qu'on peut faire l'objection que les microbes lactiques qui ne manifestent pas de pouvoir hydrolysant par la méthode d'examen employée le possèdent peut-être, mais si faible que les hexoses produits soit aux dépens du maltose, soit aux dépens du saccharose, n'existent que passagèrement comme tels et subissent l'acidification à mesure de leur production. Ceci me paraît peu probable.

#### E. — Quelques facteurs qui influencent le développement et le pouvoir acidifiant des microbes lactiques.

La plupart de ces facteurs ont fait l'objet d'études par d'autres auteurs; aussi je me limiterai à communiquer mes résultats d'expérience aussi brièvement que possible.

1° INFLUENCE DE LA DOSE DE SUCRE. — Voyons à ce sujet au tableau XIV quelques résultats d'expériences pour 2 espèces de microbes lactiques. L'acidité fut dosée après 1 jour de culture à 30° et 5 jours à 20°.

TABLEAU XIV.

ESPÈCES	EAU DE LEVURE			
	contrôle)	1 p. 100 glucose	5p. 100 glucose	10 p. 100 glucose
II	2,3	4,0	7,5	10,0
IX	2,3	3,0	6,4	9,5

Il en résulte que : 1° l'acidification est proportionnelle à la dose de sucre ; 2° relativement à la concentration du milieu en sucre, l'acidification est la plus forte pour les milieux les moins sucrés.

Ces faits sont généraux pour toutes les espèces de microbes lactiques.

2° INFLUENCE DE LA NATURE ET DE LA DOSE DE L'AZOTE. — Tous les auteurs ont qualifié la peptone d'aliment azoté préféré des microbes lactiques.

Les microbes lactiques ne forment pas d'acide aux dépens des matières azolées et la quantité d'azote nutritif n'a de l'influence sur l'acidification que jusqu'à la dose nécessaire à la multiplication du microbe acidifiant.

3° INFLUENCE DE LA RÉACTION DU MILIEU. — Les réactions neutre, légèrement acide et très légèrement alcaline sont, d'après les espèces de ferments lactiques, les seules favorables au développement de ces microbes.

Leur développement est empêché ou arrêté par une acidité correspondant, d'après les espèces, à 5 à 7 cent. cubes N p. 100 en acide lactique.

4° INFLUENCE DE L'AIR. — Les microbes lactiques sont des anaérobies facultatifs. Beijerinck les a qualifiés d'*oligoaérophiles*. Aussi bien pour le développement que pour l'acidification, les résultats de mes expériences me permettent de les diviser en *oligoaérophiles*, *aérophiles* et *indifférents* à l'air.

5° INFLUENCE DU HOUBLON. — Le houblon exerce déjà à faible dose une action entravante sur le développement des microbes lactiques. Toutes les espèces autres que celles isolées de la bière se développaient très lentement et faiblement dans du moût contenant de l'extrait à 1 p. 1.000 de houblon de Bavière ; dans du moût à 2 p. 1.000 de houblon, seules les espèces de la bière se développaient.

6° INFLUENCE DES SELS. — Ch. Richet [1 et 2] nous a appris que de très petites quantités de sels de Mg, Ba, Pt, Mn, Va, et aussi des traces d'iode accélèrent légèrement la fermentation lactique ; l'auteur a conclu :

« L'accoutumance est la loi » (1).

Des essais faits pour le sulfate de manganèse m'ont montré que des doses de  $\text{Mn SO}_4 + 7 \text{ H}_2\text{O}$  jusqu'à 50 milligrammes par 100 cent. cubes sont favorables.

Le NaCl se montre favorable aux microbes lactiques aux doses de 0 gr. 01 et 0 gr. 02 par 100 cent. cubes et commence à être nuisible à 0 gr. 05 par 100 cent. cubes.

7° INFLUENCE DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE. — J'ai fait remarquer plus haut que la fermentation alcoolique favorise les microbes lactiques vis-à-vis des autres microbes. Pour faire ressortir plus clairement l'influence de la levure dans les conditions les plus différentes j'ai fait à côté de l'ensemencement simultané de la levure et du microbe lactique, des expériences dans lesquelles je laissais d'abord se faire la fermentation lactique pendant des périodes respectivement de 3, 6, 10 et 20 jours à la température de 30° avant d'ajouter la levure. Les dosages d'acidité eurent lieu après 34 jours.

TABLEAU XV.

ESPÈCES DE MICROBES lactiques	ENSEMENCEMENT SIMULTANÉ de levure + microbe lactique	LEVURE après 3 jours de fermentation lactique	+ LEVURE après 6 jours	+ LEVURE après 10 jours	+ LEVURE après 20 jours
I	10,4	11,5	12,7	14,4	14,4
III	5,8	8,3	10,6	—	14,1
IV	13,0	13,4	18,3	19,8	19,8
V	9,6	10,1	10,2	10,9	13,3
IX	10,4	—	14,7	10,7 ?	—

Les chiffres établissent avec les résultats précédents (entre autres ceux du tableau XIII) qu'en général *la levure est un concurrent des microbes lactiques* avec cette réserve que

(1) Dans une publication [4] suivante RICHET conclut à la « mutation brusque » d'une espèce de ferment lactique sous l'influence du  $\text{TiNO}_3$ . D'après le graphique de l'auteur même, la nouvelle propriété acquise ne paraît pas héréditaire puisque, le lendemain de la prétendue mutation, le pouvoir acidifiant de l'espèce examinée est retombé notablement et paraît ce qu'il pouvait être à la suite d'une accoutumance progressive. A mon avis RICHET n'avait aucune raison de conclure à la mutation en se basant sur les données qu'il nous soumet.



quelques espèces y sont peu sensibles (espèces XI, XII, XIII).

L'acidification est d'autant plus faible qu'au moment de l'ensemencement de la levure la fermentation lactique est le plus éloignée de son maximum d'acidité. L'acidification moindre lors de l'ensemencement simultané de la levure et du microbe lactique peut s'attribuer à l'influence nuisible de l'alcool produit et, d'après les cas, au fait que la levure qui se développe plus vite accapare les matières azotées les plus assimilables et place ainsi le microbe lactique dans de mauvaises conditions de milieu.

#### F. — Longévité des microbes lactiques.

1° LONGÉVITÉ DANS DU MOÛT. — L'examen du tableau VII (1) montre que, dans des cultures dans du moût à 10° B., il reste encore des individus vivants après une conservation de quatre mois à 30° et deux mois à la température ordinaire. Il en résulte encore que les « espèces floconneuses non productrices de CO<sup>2</sup> » résistent le moins longtemps dans le milieu acidifié. Du fait que la résistance n'est pas inversement proportionnelle à l'acidité du milieu, il semble qu'il faut admettre pour chaque espèce une résistance spécifique aux acides. La mortalité de chaque espèce est cependant d'autant plus rapide que l'acidité est plus élevée et par conséquent que la concentration primitive du milieu est plus élevée.

La mortalité devient d'autant plus notable que les cultures présentent une plus grande surface à l'air. J'ai fait des expériences comparatives en bouteilles fermées complètement remplies de moût et en vases coniques contenant une couche de moût de 2 centimètres de hauteur. La virulence des cultures fut examinée après trente-quatre jours à 30°, en les ensemençant sur du moût gélosé.

Au même tableau je joins le résultat d'une série d'expériences entreprises dans le but de me rendre compte de la résistance des microbes lactiques au houblon; j'ai largement ensencé les espèces examinées; aucune d'elles ne s'est multipliée, mais, comme on le voit au tableau XVI, plusieurs ont conservé leur

(1) Les + et 0 indiquent si oui ou non les cultures contenaient encore des individus vivants.

vitalité après un mois de conservation à 30°, ce qui prouve que la dose de houblon employée, soit 2 gr. 5 par litre (0,25 p. 100) constitue pour elles une dose antiseptique, mais non bactéricide.

TABLEAU XVI.

ESPÈCES EXAMINÉES	DANS DU MOUT 10° B		DANS DU MOUT 10° B + 0,25 0/0 de houblon
	Bouteille fermée	Vase conique	
I	+	0	+
II	+	0	0
III	+	0	0
IV	+	+ très peu	0
V	+	0	0
VI	+	+	0
VII	+	+	+ peu
VIII	+	0	0
IX	+	0	+
X	+	+	+
XI	+	0	0
XII	+	+	+
XIV	+	+	+

Dans une autre série d'expériences faites avec les mêmes espèces de bactéries, j'ai remarqué que, des cultures dans du mout contenant 0 gr. 1 p. 100 de houblon, celles correspondant aux espèces VII et X contenaient encore des individus vivants après cent dix jours de conservation de culture à 30°, ainsi qu'après six mois; dans le dernier cas la conservation pendant les soixante-dix derniers jours s'est faite à la température ordinaire. Les espèces VII, X et XII qui se rapprochent le plus, de par leurs propriétés vis-à-vis du houblon, sont celles des *Lactobacterium* de la bière dont le plus résistant est le *Lb. pastor*.

LONGÉVITÉ SUR MOUT GÉLOSÉ OU GÉLATINÉ. — Des essais successifs m'ayant montré que les cultures pures de toutes les espèces de microbes lactiques avaient conservé leur vitalité après cinq mois de conservation sur du mout gélosé et à l'air, à la température ordinaire, j'indique dans le tableau XVII ci-dessous le résultat de l'examen de vitalité de ces mêmes cultures après

huit et après dix mois et demi de conservation. Après quatorze mois, aucune culture ne manifestait plus de virulence.

TABLEAU XVII.

ESPÈCES	APRÈS 8 MOIS	APRÈS 10 MOIS 1/2
I	+	0
II	+	+
III	+	0
IV	+	0
V	0	0
VI	0	0
VII	+	0
VIII	+	+
IX	0	0
X	+	0
XI	+	0
XII	+	0
XIV	0	0

On voit que la longévité des microbes lactiques sur moût gélosé à l'air varie, d'après l'espèce, entre cinq à dix mois. Je recommande cependant de repiquer les cultures pures sur milieu nouveau tous les trois mois; la conservation à la température ordinaire est désignée.

Deux causes, dans les conditions citées ci-dessus, diminuent le temps de vitalité des microbes lactiques, notamment le contact de l'air et l'acidité formée. On peut remédier à la première par la méthode des cultures en profondeur qui supprime du moins le contact direct et abondant de l'air et donne de bons résultats. L'influence de l'acide formé peut être supprimée par l'addition d'un excès de craie au milieu. La culture piquée dans un milieu additionné d'un excès de craie est la meilleure méthode de conservation des microbes lactiques.

#### G. — Classification des microbes lactiques.

En 1907 Beijerinck [2] classa les microbes lactiques au point de vue morphologique en *lactocoques* et *lactobacilles* ou *Lactobacterium*. Je m'occupe ici de la classification des *Lactobacterium* entre eux.

De toutes les propriétés physiologiques pouvant servir de base à la classification des *Lactobacterium*, j'ai donné la préférence à l'aspect qu'ils communiquent au milieu de culture liquide, parce que cette propriété facilite l'identification rapide d'une espèce à examiner. Les autres propriétés physiologiques sont d'une grande utilité dans la nomenclature des différentes espèces.

Le texte concernant l'aspect des cultures en milieu liquide ou en résumé les « Remarques générales » au tableau II peuvent servir de guide à la classification des *Lactobacterium* en deux sous-groupes. Je désigne les espèces étudiées par le nom que je propose pour chacune d'elles; entre parenthèses je mets le chiffre romain par lequel elles furent représentées dans le texte.

### 1° Groupe des *Lactobacterium floconneux*.

<i>Lactobacterium filatim</i> (III). . . . .	} Non producteurs de CO <sup>2</sup>
— <i>conglomeratum</i> (1) (V et IX) . . . . .	
— <i>flocogenum</i> (I). . . . .	
— <i>paucifermens</i> (II) . . . . .	} Producteurs de CO <sup>2</sup>
— <i>multivolaticum</i> (VI). . . . .	
— <i>multivolatigenum</i> (IV). . . . .	

### 2° Groupe des *Lactobacterium non floconneux* ou « de la tourne ».

*Lactobacterium oligoacidificans* (VII et VIII).

- *grave* (X).
- *listeri* (XI et XII) (*Bac. listeri* HENNEBERG).
- *viscogenum* (XIII).
- *delbrucki* (*Bac. delbrucki* LEICHMANN).
- *fermentum* (*Lactobacillus fermentum* BEIJERINCK).
- *pastorianum* (*Saccharobacillus pastorianus* VAN LAER).

Les autres *Lactobacterium* se développant dans la bière et déjà cité plus haut.

Toutes les espèces mentionnées dans ce groupe sont productrices de CO<sup>2</sup>, excepté le *Lactobacterium delbrucki*. Sans doute une partie des espèces étudiées par moi ont déjà été décrites par d'autres auteurs; la comparaison de mes données pour chaque espèce avec celles trouvées dans la littérature n'a

(1) Le nom *B. conglomeratus* a déjà été employé par BEIJERINCK [3] pour mentionner dans la levure de distillerie la présence d'une espèce de microbe lactique agglutinant la levure.





FIG. 4. — *Lactobacterium floccogenum* (I). (Gr. : 1180.)

FIG. 5. — *Lactobacterium parciferventans* (II). (Gr. : 1180.)

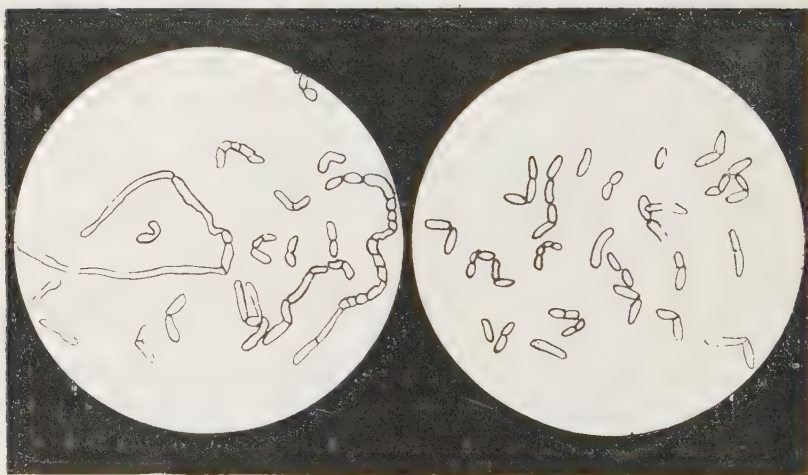


FIG. 6. — *Lactobacterium flatum* (III). (Gr. : 1180.)

FIG. 7. — *Lactobacterium multivolum* (IV). (Gr. : 1180.)

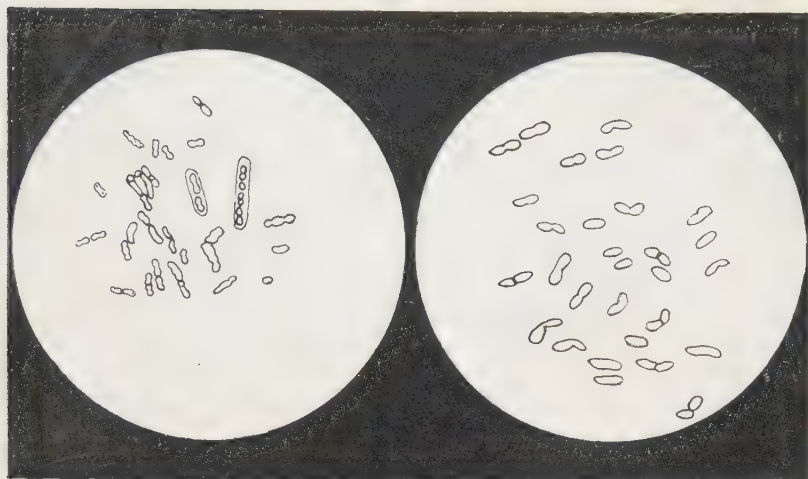


FIG. 8. — *Lactobacterium conglomeratum* I (V). (Gr. : 1180.)

FIG. 9. — *Lactobacterium multivulvatum* (VI). (Gr. : 1180.)

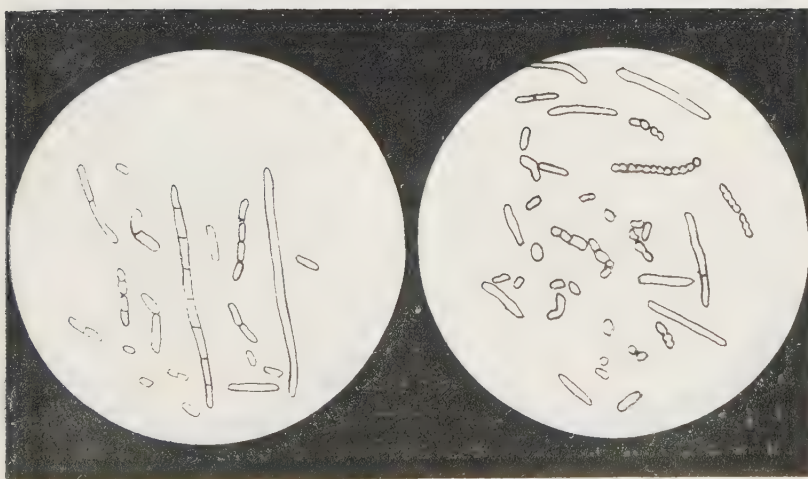


FIG. 10. — *Lactobacterium oligoacidificans* I (VII). (Gr. : 1180.)

FIG. 11. — *Lactobacterium oligoacidificans* II (VIII). (Gr. : 1180.)

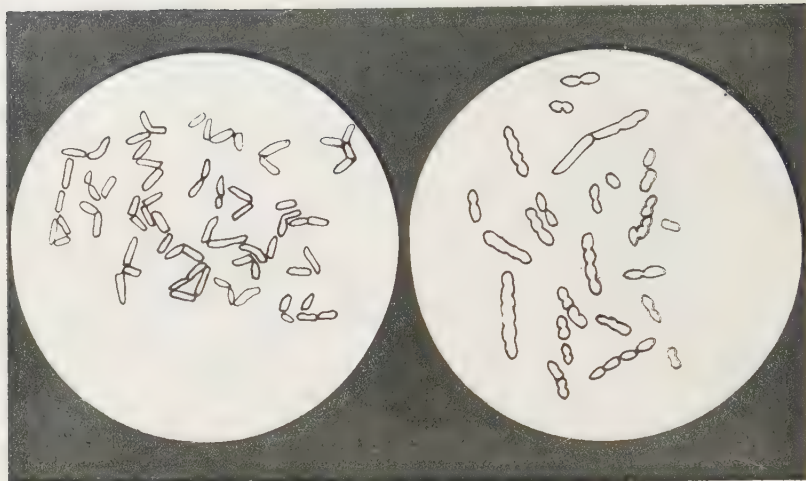


FIG. 12. — *Lactobacterium conglomeratum* II (IX). (Gr. : 1180.)

FIG. 13. — *Lactobacterium grave* (X). (Gr. : 1180.)

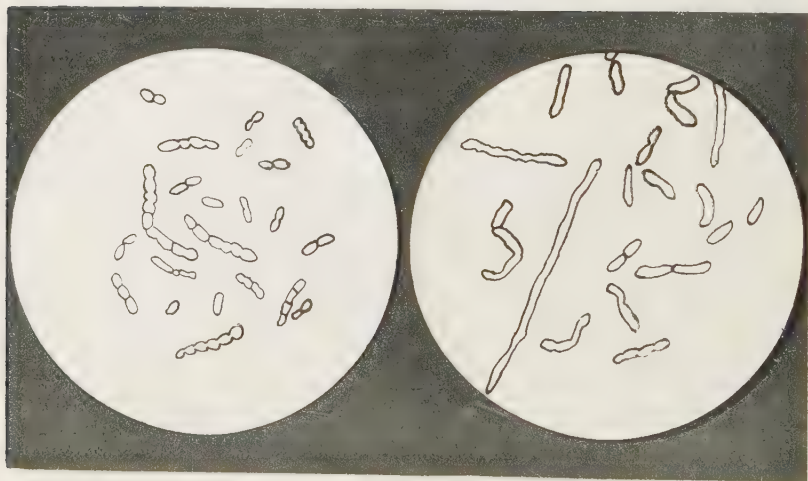


FIG. 14. — *Lactobacterium listeri* (XI) (*B. listeri* Henneberg). (Gr. 1180.)

FIG. 15. — Variété de *Lactobacterium listeri* (XII). (Gr. : 1180.)



FIG. 16. — *Lactobacterium cerevisiae*  
(Gr. : 1180.)

FIG. 17. — *Lactobacterium pastorianum* (*Saccharobac. pastorianus* Van Laer). (Gr. : 1180.)

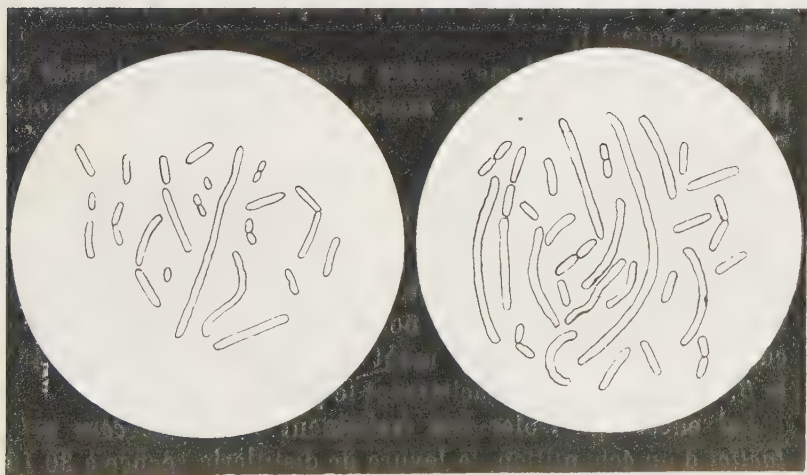


FIG. 18. — *Lactobacterium viscogenum*.  
(Gr. : 1180.)

FIG. 19. — *Lactobacterium fermentum*  
(*Lactobacillus fermentum* Beijerinck).  
(Gr. : 1180.)



cependant pu mener à une identification que pour peu d'espèces, comme on peut s'en apercevoir par le tableau ci-dessus.

Pour quelques espèces de *Lactobacterium* décrites, je me bornerai à les classer, d'après les données des auteurs, dans un des deux groupes fondamentaux :

Dans le groupe des microbes lactiques floconneux : *B. beijerincki*, *B. maerckeri*, *B. hayducti*, *B. cucumeris fermentati*, *B. leichmanni* I, II et III (tous de Henneberg); ces trois dernières espèces provoquent la congglomération à la façon de *Lactobacterium flatum*;

Dans le groupe des microbes lactiques non floconneux : le ferment mannitique de Gayon et Dubourg, *B. wortmanni*, *B. buchneri*, *B. panis fermentati* de Henneberg (Ces trois dernières espèces ont beaucoup de commun avec le *Lactobacterium fermentum Beijerinck*), *B. mannitoformum* et *B. gracile* de Müller-Thurgau.

J'avais d'abord l'intention de décrire dans une partie spéciale les différentes espèces de microbes lactiques étudiées dans ce travail, mais, dans le but de réduire les frais de publication, je me borne à communiquer leurs principaux caractères dans un tableau général I.

Pour les faits qu'il me semble nécessaire de mentionner en plus pour l'une ou l'autre espèce, j'ajouterai quelques notes sous forme de remarques.

*La récolte du Pediococcus acidi lactici Lindner.* — L'autolyse de la levure de distillerie à 45° pendant trois jours m'a toujours conduit à une culture pure du *Pediococcus acidi lactici*, aucune autre espèce de microbe lactique ne résistant aussi longtemps dans l'autolysat; nous savons qu'au contraire en culture simultanée dans le moût à la même température 45°, le *B. delbrucki* élimine facilement le pédiocoque.

J'ai encore pu isoler très facilement le *Pediococcus acidi lactici* d'un échantillon de levure de distillerie séchée à 30-40° et conservée pendant deux ans à la température ordinaire.

*Influence de l'acidité sur le pouvoir dextranogène du Lactococcus dextranicus Beijerinck* [6]. — La production de dextrane

par cette espèce aux dépens du sucre saccharose se trouve déjà empêchée par une addition au milieu saccharosé (eau de levure + 5 p. 100 saccharose) de 2,2 cent. cubes N d'acide lactique par 100 cent. cubes, alors que le développement et l'acidification se font.

*Lactobacterium filatim* (III) (fig. 6). — Dimensions et formes : sur moût gélosé cette espèce se développe en chaînettes très longues qui, à première vue, paraissent complètement unies, présentant l'aspect d'un mycelium qui s'enroule sur lui-même et s'entre-croise en formant, aux lieux de croisement et de

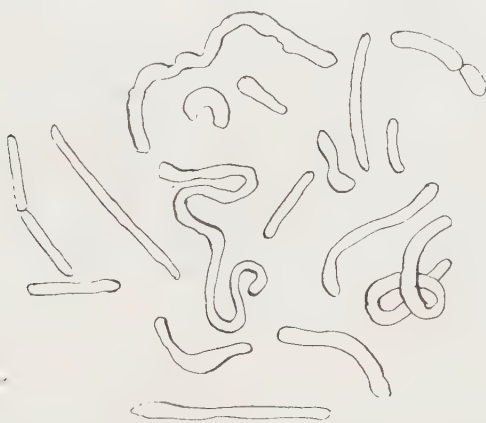


FIG. 20. — *Lactobacterium delbrueckii* (*B. delbrueckii* Henneberg.). Culture sur pâte de malt gélosée. (Gr. : 1520.)

plissement, ce qu'on peut appeler des « nœuds » qui se distinguent dans la préparation microscopique comme autant de points réfringents.

Dans du moût liquide les filaments atteignent une longueur indéterminée, s'enroulent et s'entortillent sous forme de flocons volumineux, rappelant un peu l'aspect des flocons de  $Al^3(OH)_3$  précipité fraîchement d'une solution.

Généralement la culture ne se trouble pas lorsque le milieu n'est pas très riche (plus de 10 p. 100 de sucre), que l'ensemencement ne s'est pas fait avec beaucoup de matériel microbien. Pour des milieux de culture riches le trouble est d'autant plus intense que la culture se fait à une température se rapprochant de l'optimum, pour la bonne raison que, la multiplication étant

plus rapide, il se trouve toujours plus d'individus et de flocons en suspension dans la culture.

La récolte de cette espèce se fait en autolysant la levure de distillerie à 30° et l'isolement en faisant, au moyen de l'autotysat, des stries sur du moût gélosé ; on laisse se faire la culture à 30°. J'ai pu accumuler cette espèce par l'ensemencement de la levure de distillerie fraîche dans du moût additionné de 7 p. 100 NaCl.

*Lactobacterium conglomeratum* (V) (1) (fig. 8), et *Lactobacterium floccogenum* (I) (fig. 4). — Ces deux espèces ont beaucoup de propriétés communes ; elles se développent bien aux dépens de la mannite et du sucre lactose. Elles jouissent de la propriété d'adhérer aux parois et au fond des vases de culture, comme d'ailleurs encore d'autres espèces floconneuses.

Cette dernière propriété peut être mise à profit pour leur isolement. Il suffit en effet d'enlever une trace du dépôt des parois pour arriver plus vite à une culture pure ; le dépôt peut être lavé préalablement, car l'agitation ne le fait pas décoller.

Le *Lactobacterium floccogenum* agglutine la levure, propriété qui facilite aussi l'identification et l'isolement de cette espèce.

Après un an de conservation en culture pure le *Lactobacterium floccogenum* avait conservé tout son pouvoir agglutinant. Pour le *Lactob. listeri* au contraire, le pouvoir agglutinant avait notablement diminué.

*Lactobacterium viscogenum* (XIII). — Aspect de la culture dans le moût de 10° B. : Au début du développement le liquide de culture manifeste le phénomène de la tourne. Après vingt-quatre heures à 30°, le moût est devenu trouble et visqueux ; la matière visqueuse se dépose lentement au fond de la culture, le liquide est clair après une dizaine de jours.

Dans les milieux qui restent en repos pendant tout le temps de la culture, la matière visqueuse se tasse au fond du vase et finit par se souder en une couche épaisse qui à l'agitation se soulève sous forme d'un voile uni dans le liquide.

La matière visqueuse se produit aux dépens des différents sucres essayés, mais dans une mesure différente : rapidement et

(1) Je considère comme deux variétés les espèces V et IX.

en grande quantité aux dépens du maltose et du galactose; notablement moins aux dépens du glucose, du lévulose et de la dextrine; faiblement aux dépens du saccharose.

La matière visqueuse se forme exclusivement aux dépens des sucres et est proportionnelle à la dose de ceux-ci dans les milieux de culture.

De petites doses de peptone de Witte n'ont pas d'influence; l'addition de quantités entre 1 et 5 pour 100 diminue la production de matière visqueuse.

### CONCLUSIONS

Au point de vue morphologique les microbes lactiques se distinguent en *lactocoques* et en *Lactobacterium*. Pour les espèces de chacun des 2 groupes respectivement la forme de leurs cellules, variable avec les conditions de culture, n'est qu'une donnée de plus, utile à leur identification.

L'aspect des cultures des *Lactobacterium* en milieu liquide me permet de classer ceux-ci en : a) *microbes lactiques floconneux* et b) *microbes lactiques non floconneux* ou de « la tourne ».

Les températures maximum et optimum de développement et d'acidification sont variables d'après l'espèce, toutes les espèces se développant encore lentement en dessous de 13°.

Pour la plupart des espèces l'acidification se fait assez lentement; il faut en général 20 à 30 jours à 30° avant d'atteindre le maximum d'acidité, excepté pour les *Lactob. delbrucki* et *Lactob. fermentum* qui l'atteignent en 3 jours respectivement à leur température optimum. Le maximum d'acidité est différent d'après l'espèce de microbe et d'après le milieu de culture.

Dans un milieu suffisamment riche en azote nutritif le développement et l'acidification sont proportionnels à la concentration en sucre; il faut admettre pour chaque cellule d'une espèce de microbe lactique un pouvoir acidifiant limité et fixe.

Au point de vue de la nature de l'acidité produite, de même qu'au point de vue de la nature des produits en général, les microbes lactiques se distinguent en : a) *Microbes lactiques vrais*



(non producteurs de  $\text{CO}_2$ ) donnant lieu exclusivement à la formation d'acide lactique; b) *Microbes lactiques producteurs de  $\text{CO}_2$*  qui, à côté d'une dose dominante d'acide lactique pour tous les sucres (exception faite pour le lévulose), produisent en outre une trace d'acide succinique, de l'acide acétique, un peu d'acide formique, en plus de la glycérine et des doses proportionnelles de  $\text{CO}_2$  et d'alcool.

Pour une même espèce de microbe lactique, l'intensité d'acidification des différents sucres est en général peu différente; cependant une série d'espèces, et spécialement les espèces non floconneuses montrent peu ou pas d'activité vis-à-vis du lactose, tandis que notamment les espèces floconneuses non productrices de  $\text{CO}_2$  l'acidifient bien. Pour une même espèce les produits sont qualitativement peu différents pour les sucres acidifiables, excepté pour le lévulose, aux dépens duquel les espèces productrices de  $\text{CO}_2$  forment, en outre des produits cités ci-dessus, de la mannite et une plus grande proportion d'acide volatil.

Tous les espèces de microbes lactiques réduisent le sélénite et le tellurate de sodium. Les espèces ne produisant pas trace d'acide volatil ne réduisent ni le soufre, ni le bleu de méthylène, ni le lévulose; les espèces productrices de  $\text{CO}_2$  les réduisent, et j'ai établi que, pour chaque espèce et pour une culture donnée, *il existe un rapport constant entre le pouvoir réducteur et les doses de  $\text{CO}_2$  et d'acide volatil produites*. Les doses de  $\text{CO}_2$  et de l'acide volatil sont des mesures du pouvoir réducteur; cependant la réduction proprement dite se fait indépendamment de la fermentation lactique sans production d'une trace de  $\text{CO}_2$ , ce dont je me suis rendu compte en séparant le pouvoir ferment du microbe de son pouvoir réducteur. La réduction doit s'attribuer à une endo-enzyme (du microbe lactique) que je voudrais appeler *lévulo-mannitase*.

Les microbes lactiques floconneux, et spécialement parmi ceux-ci les non-producteurs de  $\text{CO}_2$ , attaquent et acidifient la mannite; celle-ci n'est pas acidifiée par les espèces non floconneuses; on peut encore dire que la mannite n'est pas acidifiée par les espèces qui la produisent par réduction aux dépens du lévulose.

Le lactate de calcium n'est attaqué par aucune espèce de

microbe lactique. Quelques espèces produisent une trace de développement aux dépens du malate de Ca.

Une partie des espèces décomposent l'indican et l'esculine, mais non l'amygdaline; d'autres n'ont aucune action sur les glucosides.

Tous les microbes lactiques sont nuisibles à la levure et à la fermentation alcoolique, mais dans une mesure très différente suivant l'espèce; la nocivité résulte de l'action des acides formés et en plus, dans certains cas, de l'agglutination des cellules de levure provoquée par certaines espèces de microbes lactiques. *Une espèce est d'autant plus nuisible qu'en culture simultanée avec la levure, elle produit une plus grande quantité d'acide et que l'acidité totale est constituée pour une plus grande partie d'acide volatil.*

L'acide lactique n'est que faiblement nuisible; sa nocivité augmente avec la dose, mais il n'arrête pas la fermentation alcoolique aux doses telles que le produisent les microbes lactiques; au contraire 0 gr. 092 p. 100 d'acide formique et respectivement 0 gr. 5 pour 100 d'acide acétique arrêtent (d'après Johannessohn) complètement l'action de la levure.

*Le principe agglutinant des espèces de microbes lactiques agglutinants est probablement constitué par de la matière visqueuse produite par eux;* l'agglutination et l'isolement des cellules et flocons de cellules de levure sont d'autant plus parfaits et la nocivité d'autant plus prononcée que l'espèce agglutinante produit plus de matière visqueuse.

Il faut admettre une constitution enzymatique différente des espèces du groupe des microbes lactiques vrais d'une part, et de celles du groupe des microbes lactiques producteurs de  $\text{CO}^2$  d'autre part.

Dans les microbes lactiques vrais se manifeste seulement une *lacto-acidase* ( $\text{C}^6 \text{H}^{12} \text{O}^6 = 2 \text{C}^3 \text{H}^6 \text{O}^3$ ). Dans les espèces productrices de  $\text{CO}^2$  se manifestent : a) Une *lacto-acidase* indépendante, dans son action productrice d'acide lactique, des autres enzymes du protoplasme et b) *un complexe d'enzymes*, à mon avis, à action parallèle, et dont tous les produits pourraient s'exprimer par une seule réaction.

Dans aucune espèce de microbe lactique, je n'ai pu découvrir de *malto-glucose*, ce qui me fait admettre que le maltose

subit l'acidification sans hydrolyse préalable. Une partie des microbes lactiques, spécialement les espèces floconneuses, possèdent de l'*invertase*, tandis que d'autres, spécialement les espèces non floconneuses, n'invertissent pas le saccharose et cependant l'acidifient.

Dans un milieu suffisamment riche en azote nutritif l'acidification par les microbes lactiques augmente seulement avec la dose de sucre et non avec la dose d'azote assimilable; les microbes lactiques ne forment pas d'acide aux dépens des matières azotées pures assimilables par eux.

Les réactions neutre, légèrement acide ou très légèrement alcaline sont, d'après les espèces, les seules favorables aux microbes lactiques; à une acidité de 5 à 7 cent. cubes N p. 100, leur développement se trouve empêché; dans le milieu de culture où la multiplication a été arrêtée par l'acidité produite, l'acidification continue par les cellules présentes jusqu'à un maximum déterminé pour chaque espèce.

Au point de vue de l'influence de l'air on peut diviser les microbes lactiques en *oligoaérophiles*, *indifférents* et *aérophiles*. Les espèces productrices de  $\text{CO}_2$  provoquent relativement à l'acidité fixe plus d'acide volatil à l'air qu'à l'abri de l'air.

L'alcool a sur les microbes lactiques une influence défavorable, variable avec les espèces.

Les microbes lactiques, autres que celles de la bière, ne se développent que très lentement dans du moût contenant 0 gr. 4 p. 100 de houblon de Bavière; à cette même dose de houblon et en culture simultanée avec de la levure, seules les espèces de la bière se développent.

En culture pure les microbes lactiques sont favorisés par NaCl jusqu'à une dose dépassant 0 gr. 02 p. 100 et légèrement inférieure à 0 gr. 05 p. 100; certaines espèces peuvent encore se développer légèrement dans du moût contenant 10 p. 100 NaCl.

En général, la levure et les microbes lactiques, quoique vivant très bien en culture symbiotique, sont des concurrents l'un pour l'autre; à part quelques espèces (*Lactobact. floccogenum*, *Lactobact. listeri* et *Lactobact. viscogenum*) les microbes lactiques sont défavorisés par la fermentation alcoolique, par la levure.

La longévité des microbes lactiques sur moût gélosé à l'air et à température ordinaire varie, suivant les espèces, entre 5 et 10 mois et demi; en culture repiquée, la plupart conservent la vitalité plus d'un an; la méthode la plus désignée pour une longue conservation est la culture piquée dans du moût additionné d'un excès de craie.

(Travail fait au Laboratoire de Microbiologie de l'Ecole technique supérieure à Delft. Sa publication fut retardée par le fait de l'égarement de mon manuscrit à Paris, en 1918.)

Ertvelde, le 15 janvier 1920.

# BIBLIOGRAPHIE

- BARENDRECHT, Die Agglutination der Hefe. *Centralbl. f. Bakter.* 1901, p. 623.
- BERTRAND et DUCHACEK, Action du ferment bulgare sur les principaux sucres. Ces *Annales*, 1909, p. 402.
- BERTRAND et WEISWEILLER, Action du ferment bulgare sur le lait. Ces *Annales*, 1906, p. 977.
- BEIJERINCK [1]. Sur les ferments lactiques de l'industrie. *Arch. néerl. des Sc. ex. et natur.*, 1901.
- [2], Fermentation lactique dans le lait. *Arch. néerl. des Sc. ex. et natur.*, 1907, p. 337.
- [3], Phénomènes de réduction produits par les microbes. *Arch. néerl. des Sc. ex. et natur.*, 1904, 9, p. 436; *Verslagen Koninkl. Akademie Amsterdam*, 1906-1907, p. 886 et [2].
- [4], Die Erscheinung der Hockbildung oder Agglutination bei Alkoholhefen. *Centralbl. f. Bakter.* 1908, p. 641.
- [5], *Arch. néerl. des Sc. ex. et nat.*, 23, 1889, p. 367.
- [6], Die durch Bakterien aus Rohrzucker erzeugten schleimigen Wandstoffe. *Folia microbiologica*, octobre 1912.
- BREDMAN, Bacillus amylobacter A. M. et Bredeman. *Centralbl. f. Bakter.*, 2. Abt., 1909, 23, p. 385.
- BURONSKY, Ueber den Einfluss der organischen Säuren auf die Hefe. *Centralbl. f. Bakter.*, 1915, 42, p. 530.
- DUCLAUX, Sur le dosage des acides volatils. Ces *Annales*, 1895, p. 265.
- GAYON et DUBOURG [1], Sur les vins mannités. Ces *Annales*, 1894, p. 108.
- [2], Nouvelles recherches sur le ferment mannitique. Ces *Annales*, 1901, p. 527.
- HASTINGS, EVANS et HART. *Bull. de l'Inst. Pasteur*, 1913, p. 538.
- HENNEBERG [1]. *Bakteriolog. Praktikum*.
- [2], Zur Kenntnis der Milchsäurebakterien. *Zeitsch. f. Spiritusindustrie*, 1903, n° 22-31.
- HERZOG, Sur la fermentation lactique. *Bull. de l'Inst. Pasteur*, 1903, p. 381.
- JOHANNES-SONN, Einfluss organischer Säuren auf die Hefegärung. *Bioch. Zeitsch.*, 1912-1913, 47 48, p. 97.
- KAYSER [1], Etudes sur la fermentation lactique. Ces *Annales*, 1894, p. 737.
- [2], Contribution à l'étude de la fermentation lactique. *Bull. de l'Inst. Pasteur*, 1905, p. 144.



MAZÉ et PACOTTET, Recherches sur les ferments de maladies des vins. *Ces Annales*, 1904, p. 245.

MAZÉ et PERRIER, Sur la production de la mannite par les ferments des maladies des vins. *Ces Annales*, 1903, p. 587.

MÜLLER-THURGAU et OSTERWALDER, Die Bakterien in Wein u. Obstwein und die dadurch verursachten Veränderungen. *Centr. f. Bakter.*, 36, p. 129, 330.

OSTERWALDER, Milchsäurebildung durch Essigbakterien. *Bull. de l'Inst. Pasteur*, 1913, p. 680; voir MÜLLER-THURGAU.

PASTEUR [1]. *Etudes sur la bière*.

— [2]. *Etudes sur le vin*.

POTTEVIN, Contribution à l'étude de la fermentation lactique. *Ces Annales*, 1898, p. 49.

RICHE [1], De l'action des métaux à faible dose sur la fermentation lactique. *Bull. Inst. Pasteur*, 1906, p. 441.

— [2], De l'action stimulante des sels de Mg sur la fermentation lactique. *Bull. Inst. Pasteur*, 1916, p. 15.

— [3], Adaptation des microbes (ferment lactique) au milieu. *Ces Annales*, 1915, p. 22.

— [4], La fermentation lactique et les sels de thallium. Etude sur l'hérédité. *Ces Annales*, 1917, p. 51.

ROSENBLATT (M. et Mme), Action des acides sur la fermentation alcoolique. *Ces Annales*, 1914, p. 714.

SCHÖNFELD et ROMMEL. *Woch. f. Brauerei*, 1902, 49, p. 585.

SMIT, Bakteriöl. en chemische Onderzoekingen over de melkzuurgisting. *Thèse Amsterdam*, 1913.

SÖHNGEN, Ueber die reducirende Eigenschaften der Essigbakterien. *Folia Microbiologica*. Jahrg. III, 1914, p. 151.

VAN LAAR, Contribution à l'histoire des ferments des hydrates de carbone: bacille des bières tournées: *Saccharobacillus pastorianus*. *Mémoires couronnés et autres Mém. de l'Acad. royale de Belgique*, 47, 1892-1893.

VAN STEENBERGE, L'autolyse de la levure et de l'influence de ses produits de protéolyse sur le développement de la levure et des microbes lactiques. *Ces Annales*, 1917, p. 601.

WEIGMANN d'après E. KAYSER. *Traité de microbiologie agricole*, 1914, p. 344.

# DE LA PATHOGÉNIE DU CHOLÉRA

(QUATRIÈME MÉMOIRE)

## LE GASTRO-ENTÉROTROPISME DES VIBRIONS

par le Professeur G. SANARELLI,

Directeur de l'Institut d'Hygiène de l'Université de Rome.

### I

#### Le sort des vibrions qui s'échappent du péritoine chez le cobaye.

##### 1. — LE PLASMA SANGUIN DE COBAYE NE POSSÈDE AUCUN POUVOIR VIBRIONICIDE.

J'ai montré dans les précédents mémoires que les vibrions injectés dans la cavité péritonéale des cobayes, au lieu d'y périr, s'en éloignent rapidement, en très grande partie, à travers les voies lymphatiques de l'épiploon et du mésentère. Il était donc nécessaire de connaître avec plus de précision leur destin ultérieur.

Où et dans quel état vont aboutir les vibrions qui s'échappent du péritoine?

La première hypothèse qui se présente à l'esprit est qu'ils rejoignent la circulation du sang par la voie lymphatique.

On sait que, chez les mammifères, la lymphe se déverse dans les veines sous-clavières par le canal thoracique et la grande veine lymphatique.

Dans ce cas, admis que les vibrions achèvent leur émigration dans le sang circulant, il faut reconnaître que cet exode doit se terminer par leur mort.

La plupart des auteurs, en effet, qui ont étudié la façon de se comporter des vibrions cholériques dans le sang, dans le sang du cobaye plus particulièrement, affirment que le plasma

sanguin de ces animaux est doué d'une énergique action vibrionicide.

Les premières constatations de Wyssokowitsch (1) sur le pouvoir vibrionicide du sérum sanguin de cobaye ont été, plus tard, confirmées par les expériences de Vincenzi (2), de Tizzoni et Cattani (3), de Behring et Nissen (4), et enfin de Pfeiffer et de Kolle.

« Si à un cobaye neuf on injecte des bactéries vivantes du choléra dans le courant circulatoire, notamment dans la carotide, — a écrit Pfeiffer (5), — on constate que la plupart de ces bactéries, après quelques minutes, sont déjà mortes. » « Les vibrions injectés dans la carotide — a ajouté Kolle (6) — meurent rapidement en quelques minutes. Même en employant de fortes doses, de quatre à huit fois supérieures à la dose mortelle minima, quelques heures après l'injection, on ne trouve plus de vibrions, ni dans le sang, ni dans les organes. » Mais comme je n'étais pas convaincu de ce pouvoir vibrionicide du sérum, surtout après d'autres expériences de Vincenzi (7) et de Sobernheim (8), plus particulièrement j'ai cru nécessaire de reprendre plus méthodiquement l'étude de l'influence du sang circulant sur les vibrions injectés.

En saignant à la carotide deux cobayes A et B, pesant respectivement 250 grammes et 480 grammes, on obtient la quantité de sérum suffisante pour les recherches à effectuer d'après le procédé opératoire décrit dans le précédent mémoire à propos de la lymphe péritonéale.

Dans chaque centimètre cube de sérum on ensemence la quantité calculée, comme ci-dessus, d'environ 800.000 vibrions;

(1) Ueber die Schicksale der in's Blut injicirten Microorganismen im Körper der Warmblüter. *Zeitschr. für Hygiene u. Infekt.*, 1886, **1**, p. 26.

(2) Ricerche sperimentali col bacillo virgola del Koch. *Bollettino della R. Accad. med. di Roma*, 1887, **7**, p. 438.

(3) Recherches sur le choléra asiatique. *Beiträge zur path. Anatomie und allgem. Pathologie*, 1887, **3**, p. 224.

(4) Ueber bacterienfeindliche Eigenschaften verschiedener Blutserumarten. *Zeitschr. f. Hygiene*, 1890, **8**, p. 425, 429 et 448.

(5) Studien zur Choleraätiologie. *Zeitschr. f. Hygiene*, 1894, **16**, p. 272.

(6) Beiträge zu den experimentellen Cholera-Studien an Meerschweinchen, *Zeitschr. f. Hygiene*, 1894, 1894, **16**, p. 336 et 358.

(7) Nuove ricerche sperimentali sul cholera. *Arch. per le Sc. med.*, 1893, **17**, p. 142.

(8) Experimentelle Untersuchungen über Cholera Gift und Cholera Schutz. *Zeitschr. f. Hygiene*, 1893, **14**, p. 505.

on laisse le sérum à 37° C et, à différents moments successifs, on prélève une anse normale qu'on ensemence tout de suite sur gélose en eau peptonée et sur des plaques de gélatine.

Les résultats de ces expériences sont résumés dans les tableaux suivants I et II.

TABLEAU I. — Sérum de sang du cobaye A (250 gr.) ensemencé avec 800.000 vibrions par centimètre cube.

CULTURES en	IMMÉ- DIATE- MENT	APRÈS								
		5 min.	15 min.	30 min.	1 h.	2 h.	4 h.	6 h.	10 h.	24 h.
Gélatine.	13.300	13.800	10.300	10.900	13.300	13.300	12.500	13.000	11.100	∞
Gélose .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Eau pep- tonée .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABLEAU II. — Sérum de sang du cobaye B (480 gr.) ensemencé avec 800.000 vibrions par centimètre cube.

CULTURES EN	IMMÉ- DIATE- MENT	APRÈS						
		15 min.	30 min.	1 h.	3 h.	5 h.	8 h.	24 h.
Gélatine. . . . .	12.000	12.000	12.000	10.000	10.000	12.000	12.000	∞
Gélose . . . . .	100	100	100	80	80	100	100	∞
Eau peptonée. . . .	+	+	+	+	+	+	+	+

De ces expériences il résulte, d'une façon très nette, que le sérum de sang d'un cobaye neuf, jeune ou adulte, n'est point du tout vibrionicide.

Au contraire, après une légère diminution de germes, qui se produit dans les premières heures faisant suite à l'ensemencement, le sérum lui-même constitue un excellent milieu pour les bacilles virgule.

Mais il importait de constater si cette légère diminution préliminaire de vibrions se rattachait à une action spécifique quel-



conque du sérum ou au simple fait du changement de milieu.

Pour éliminer ce dernier doute, j'ai répété, à titre de contrôle, les mêmes expériences, en employant, au lieu de sérum, l'eau peptonée, le bouillon de viande et la solution physiologique (Tableaux III, IV et V).

TABLEAU III. — Eau peptonée (ensemencée comme ci-dessus).

CULTURES EN	IMMÉ- DIATE- MENT	APRÈS						
		15 min.	30 min.	1 h.	3 h.	5 h.	8 h.	24 h.
Gélatine. . . . .	4.000	4.000	3.500	2.000	2.000	3.500	5.000	∞
Gélose . . . . .	++	++	++	++	++	++	++	+++

TABLEAU IV. — Bouillon (ensemencé comme ci-dessus).

CULTURES EN	IMMÉ- DIATE- MENT	APRÈS						
		15 min.	30 min.	1 h.	3 h.	5 h.	8 h.	24 h.
Gélatine. . . . .	4.500	3.200	4.800	1.600	3.200	6.200	6.200	∞
Gélose . . . . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

TABLEAU V. — Solution physiologique (ensemencée comme ci dessus).

CULTURES EN	IMMÉ- DIATE- MENT	APRÈS						
		15 min.	30 min.	1 h.	3 h.	5 h.	8 h.	24 h.
Gélatine. . . . .	9.600	9.600	8.000	4.800	4.800	8.000	8.000	∞
Gélose . . . . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

On est ainsi amené à conclure que, même en ensemençant les vibrions dans des milieux de culture appropriés, ou dans des liquides à peu près indifférents, on constate au bout de

la première heure une considérable diminution de germes.

Par conséquent, cette transitoire diminution de vibrions que l'on observe dans le sérum des cobayes neufs, attribuée par certains auteurs à la présence de quelque anticorps dans le plasma sanguin, n'a nullement le caractère qu'on lui a reconnu jusqu'ici.

Afin d'établir les différences entre la façon de se comporter du sérum de cobaye normal et du sérum de cobaye vacciné vis-à-vis du vibron cholérique, j'ai tenu à compléter ces recherches par une dernière expérience, pratiquée avec du sérum d'un cobaye bien fortement immunisé contre le vibron du choléra.

En voici les résultats (Tableau VI) :

TABLEAU VI. — Sérum de cobaye immunisé contre le vibron, ensemencé avec 800.000 vibrions par centimètre cube.

CULTURES EN	IMMÉ- DIATE- MENT	APRÈS						
		15 min.	30 min.	1 h.	3 h.	5 h.	8 h.	24 h.
Gélatine. . . . .	11.000	9.000	7.200	4.000	0	0	0	0
Gélose . . . . .	+++	+++	+++	+++	0	0	0	0
Eau peptonée. . . .	+	+	+	+	0	0	0	0

On peut donc conclure que le sérum de sang des cobayes neufs n'a aucun pouvoir vibrionicide spécifique.

Ce pouvoir n'est possédé, et dans une mesure assez énergique, que par le sang de cobayes vaccinés.

Par conséquent il ne peut pas être question de cette rapide et totale extermination, supposée par Pfeiffer et Kolle, des vibrions injectés dans la cavité péritonéale et pénétrés ensuite dans le courant sanguin, en s'y déchargeant à travers les vaisseaux lymphatiques.

## 2. — COMMENT SE DISTRIBUENT DANS L'ORGANISME DU COBAYE LES VIBRIONS INJECTÉS DANS LE PÉRITOINE.

La démonstration de l'absence du prétendu pouvoir vibrionicide du sérum sanguin du cobaye conduit à se poser la question :

Pourquoi, à l'autopsie des cobayes morts de « péritonite cholérique », constate-t-on que les cultures faites avec le sang sont généralement stériles?

Et puisque, dans ces cas, nous avons vu que les mêmes cultures du péritoine sont stériles ou à peu près, où et comment vont finir les vibrions injectés après leur pénétration dans le courant sanguin, lorsque les cobayes survivent?

Comment et pourquoi succombent les cobayes lorsqu'on leur inocule dans le péritoine des doses mortelles?

Pour répondre à ces différentes questions j'ai cru nécessaire d'entreprendre quelques autres recherches.

J'ai injecté dans le péritoine de cobayes, jeunes ou adultes, une dose non mortelle de vibrions (un tiers de culture) et j'ai ensuite sacrifié les animaux à différents intervalles — à partir de quinze minutes après l'injection jusqu'à plusieurs jours de suite afin de suivre, au moyen de cultures faites non seulement avec le sang, mais avec tous les viscères, ainsi qu'avec le contenu des différentes portions du canal digestif, les migrations des vibrions, leur façon de se comporter et leur issue finale.

Dans une première série, j'ai employé de jeunes cobayes du poids moyen de 250 grammes; dans une deuxième série je me suis servi, au contraire, de cobayes plus robustes d'environ 450 grammes.

Les animaux ont été tués, à tour de rôle, avec de l'éther et les prélèvements du sang, de la bile et des différentes sérosités (péritoine, plèvre, péricarde), ainsi que du suc des différents viscères (poumons, foie, rate, rein) et du contenu des différentes portions du canal digestif (estomac, duodénum, intestin grêle, iléum, cæcum), ont été faites exclusivement avec des pipettes de verre, afin de recueillir des quantités suffisantes de matériel.

Ces échantillons ont étéensemencés, chaque fois, dans des tubes et dans des ballons d'eau peptonée et dans des tubes de gélose.

Lorsqu'il s'agissait du contenu intestinal, le matériel introduit et étendu, avec les mêmes pipettes, à la surface d'un premier tube de gélose, a été repris avec une grosse anse de platine etensemencé successivement avec la même anse, sans

la recharger, dans un deuxième, dans un troisième et même dans un quatrième tube, selon la quantité de contenu microbien constaté, chaque fois, sommairement, à l'examen microscopique.

En suivant ce simple procédé, l'étude des cultures du contenu intestinal des cobayes, comme de celui des lapins, est très rapide et beaucoup plus facile et plus simple qu'on ne le croit.

Les espèces microbiennes aérobies cultivables dans l'intestin de ces herbivores se réduisent ordinairement à une seule : au *B. coli*.

D'autres germes comme les *B. mesentericus*, les staphylocoques, les streptocoques, le pyocyanique, le *subtilis*, etc., doivent être considérés comme accidentels. Ils apparaissent rarement dans les cultures et, par conséquent, ne troublent que dans des cas isolés l'étude de la flore intestinale cultivable.

Lorsqu'il résulte d'un examen microscopique préliminaire que les microbes intestinaux sont très abondants, on dilue le matériel ensemencé dans le premier tube, en continuant à passer simplement l'anse de platine à la surface d'un quatrième et même d'un cinquième tube de gélose. De cette façon on réussit à obtenir des cultures très démonstratives, sur lesquelles il est possible de faire, même à l'œil nu, la numération des colonies et de fixer non seulement la nature, mais aussi la proportion respective des germes développés.

Quand on a acquis un peu de pratique, ces recherches sont assez faciles et le tableau bactériologique de l'animal, mort ou sacrifié, se présente de la façon la plus nette. Même dans les cas en apparence les plus obscurs et les plus exceptionnels, par exemple dans les cas compliqués ou masqués par des infections secondaires survenues, on arrive facilement à reconstituer, comme nous le verrons mieux ailleurs, le développement du processus infectieux dans ses différentes phases, dans ses complications et dans ses résultats.

Il serait inutile et encombrant de rapporter, même sommairement, les protocoles de toutes ces expériences. Je me bornerai donc à en résumer les conclusions dans les deux tableaux suivants :



TABEAU VII. — *Série A* : IX cobayes d'environ 250 grammes inoculés dans le péritoine avec une dose non mortelle (1/3 de culture) de vibrions et sacrifiés à différentes périodes.

VISCÈRES CULTIVÉS	I <sup>e</sup> 30 min.	II <sup>e</sup> 1 h.	III <sup>e</sup> 2 h.	IV <sup>e</sup> 4 h.	V <sup>e</sup> 6 h.	VI <sup>e</sup> 12 h.	VII <sup>e</sup> 24 h.	VIII <sup>e</sup> 2 jours	IX <sup>e</sup> 4 jours
Plèvre . . . .	+	+	+	+	+	—	—	—	—
Thymus . . . .	+	+	+	+	+	—	—	—	—
Poumon D. . .	+	+	+	+	+	—	—	—	—
— G. . . . .	+	+	+	+	+	—	—	—	—
Péricarde. . .	+	+	+	+	+	—	—	—	—
Sang. . . . .	+++	+++	+	+	+	—	—	—	—
Foie . . . . .	+++	++	+	++	++	—	—	—	—
Bile . . . . .	+	8	+	+	+	—	—	—	—
Rate . . . . .	+	+	+	+	+	—	—	—	—
Rein . . . . .	+	+	+	+	++	—	—	—	—
Péritoine. . .	8	+++	+++	+++	++	+	—	—	—
Estomac . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Duodénum. . .	+	+	—	+	++	—	—	—	+
Intestin grêle.	++	+++	++	+++	++	—	+	—	+++
Iléum . . . .	++	+++	++	+++	+++	—	+	—	+++
Cæcum . . . .	++	+++	+++	+++	+++	—	+	+	+++

TABEAU VIII. — *Série B* : XI cobayes d'environ 450 grammes inoculés dans le péritoine avec une dose non mortelle (1/3 de culture) de vibrions et sacrifiés à différentes périodes.

VISCÈRES CULTIVÉS	I <sup>e</sup> 15 min.	II <sup>e</sup> 1 h.	III <sup>e</sup> 2 h.	IV <sup>e</sup> 4 h.	V <sup>e</sup> 6 h.	VI <sup>e</sup> 12 h.	VII <sup>e</sup> 24 h.	VIII <sup>e</sup> 2 j.	IX <sup>e</sup> 5 j.	X <sup>e</sup> 7 j.	XI <sup>e</sup> 9 j.
Plèvre . . . .	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—
Thymus . . . .	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—
Poumon D. . .	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—
— G. . . . .	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—
Péricarde. . .	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—
Sang. . . . .	++	++	+	+++	+	—	+	—	—	—	—
Foie . . . . .	+	+	+	+	+	—	+	—	—	—	—
Bile. . . . .	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—
Rate . . . . .	+	+	+	+	+	—	+	—	—	—	—
Rein . . . . .	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
Péritoine. . .	8	++	+	+	+	—	+	—	—	—	—
Estomac . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Duodénum. . .	+	+	—	—	++	—	—	—	—	—	—
Intestin grêle.	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
Iléum . . . .	+	+++	—	+	+++	++	+	—	—	—	—
Cæcum. . . .	++	+++	+	+	+++	++	—	—	+	+	—

Dans ces tableaux sont indiqués, par les signes conventionnels habituels, le nombre plus ou moins abondant des colonies cholériques qui se sont développées dans les tubes de gélose ou le résultat négatif des cultures pratiquées avec les différents organes.

Il est à considérer, en premier lieu, que ces tableaux résument les résultats moyens de plusieurs expériences. Les animaux, même s'ils ont le même poids et s'ils sont inoculés dans le péritoine avec les mêmes doses de vibrions, ne se comportent pas toujours de la même manière. Quelques animaux se débarrassent des vibrions inoculés, d'une façon exceptionnellement précoce, d'autres, au lieu de supporter parfaitement la dose habituellement non mortelle, tombent au contraire gravement malades et même succombent. D'où la nécessité de répéter les observations.

Cependant, de l'ensemble de ces expériences, on peut conclure que les vibrions injectés dans le péritoine des cobayes, à des doses non mortelles, se comportent d'ordinaire de la façon suivante :

Quelques minutes après l'injection, les vibrions, une fois traversée la fragile barrière endothéliale du péritoine, ont déjà fait irruption dans le sang, se répandant de la sorte immédiatement dans tous les viscères, dans la bile et dans l'intestin.

Cette dissémination est toujours plus abondante chez les cobayes jeunes que chez les cobayes adultes.

La diminution des vibrions dans le péritoine s'accroît d'une façon presque progressive, dès la première heure après l'injection.

Une diminution notable ne se remarque dans les cobayes jeunes, que vers la douzième heure ; au contraire, chez les cobayes adultes et plus résistants, à cette même heure survient la disparition totale des vibrions.

Dans le sang, les germes se trouvent, dès les premiers moments, en nombre si abondant, qu'on peut penser à l'éclosion d'un processus septicémique.

Mais, à partir de la deuxième heure, le nombre des vibrions commence à diminuer. Vers la sixième heure, ils sont encore plus réduits et, au bout de douze heures, les cultures sont généralement négatives.

Quant à la bile et au suc des différents organes, leur contenu en vibrions suit, en général, les mêmes oscillations que celles présentées par le sang.

### 3. — LOCALISATION ÉLECTIVE INTESTINALE DES VIBRIONS INTRODUITS DANS LE PÉRITOINE.

Les résultats bactériologiques du contenu gastro-intestinal ont pris cependant une importance toute spéciale.

Ce n'est pas le cas, pour le moment, de nous arrêter sur le résultat constamment négatif du contenu gastrique. L'acidité normale de l'estomac, comme nous le verrons plus loin, a une action vibrionicide d'un effet presque instantané. Cela explique, aussi bien chez les cobayes que chez les lapins, l'habituelle stérilité du contenu gastrique où on ne parvient à cultiver, et très rarement, que quelques sporogènes aérobies ou anaérobies (*B. mesentericus*, *B. subtilis*, *B. putrificus*).

Quant au duodénum, comme je l'ai toujours constaté également dans de nombreuses expériences faites sur les lapins, son contenu en vibrions dépend, en général, de leur élimination à travers les voies biliaires.

Ce qui a plus d'importance et de signification c'est, au contraire, la précoce et abondante présence de vibrions dans l'intestin grêle (jéjunum), dans l'iléum et dans le cæcum.

Il faut dire ici que les auteurs qui ont étudié la prétendue péritonite cholérique des cobayes, préoccupés, peut-être à l'excès, du seul processus local, ont généralement négligé de fixer particulièrement leur attention sur le contenu du canal digestif et sur l'état de sa muqueuse.

« A l'autopsie des cobayes injectés dans le péritoine avec « des vibrions vivants du choléra — a écrit R. Pfeiffer — les « anses intestinales peuvent apparaître de teinte rose, mais « souvent elles montrent le coloris gris pâle habituel (1). »

Ainsi, la plupart des auteurs ont cru peut-être pouvoir passer légèrement sur ce point, regardé par Pfeiffer lui-même comme insignifiant. Au contraire, comme nous le verrons, ce point a une grande et décisive importance.

(1) Untersuchungen über das Cholera-gift. *Zeitschr. für Hygiene*, 1892, **41**, p. 399.

En effet, l'examen des parois intestinales et du contenu intestinal, dans les cobayes qui meurent de « péritonite cholérique » n'est pas si banal et si négligeable que le ferait supposer la laconique indication de R. Pfeiffer. Au contraire, il a une valeur prédominante et, en certains cas particuliers, il réserve des révélations inattendues de la plus haute signification.

En réalité, l'appareil digestif des cobayes qui meurent de « péritonite cholérique » ou qui sont tués à différents intervalles après l'injection péritonéale de doses non mortelles de vibrions, est presque toujours plus ou moins altéré.

Les altérations consistent, même au simple examen externe, dans une rougeur plus ou moins intense, c'est-à-dire dans une hyperhémie inflammatoire plus ou moins étendue, accompagnée d'œdème diffus qui intéresse spécialement une grande portion de l'intestin grêle et, parfois, l'iléum. Mais le processus inflammatoire de la muqueuse est presque toujours accompagné d'un contenu diarrhéique qui, souvent, est muqueux et, parfois, nettement séreux et abondant.

L'examen microscopique démontre les éléments d'une entérite desquamative aiguë et la réaction de la benzidine révèle souvent aussi la présence de pigment sanguin.

A l'occasion des expériences faites en série sur les cobayes, j'ai pu constater que les signes de cette entérite se manifestent bientôt, deux heures à peine après l'injection des vibrions dans la cavité péritonéale et, dans les cas de guérison, persistent même longtemps après (9 jours) la disparition totale des vibrions.

Quant à la présence des vibrions, surtout dans les dernières portions du canal digestif, elle est si habituelle et si abondante que, souvent, dans les cultures sur gélose inclinée, les colonies cholériques se développent en quantité innombrable et à l'état de pureté absolue.

Comme on le voit par les tableaux ci-dessus, l'excrétion intestinale des vibrions commence de bonne heure; on la constate même quinze minutes après leur introduction dans le péritoine; elle continue, abondante, pendant un certain temps et ne diminue visiblement qu'à partir de la douzième heure.

Mais l'excrétion intestinale ne cesse pas toujours complètement.



Quelquefois, même quand les vibrions ont déjà disparu depuis plusieurs jours non seulement du sang, mais de tous les organes et même de la bile — qu'on peut considérer comme un constant émonctoire ou réservoir de vibrions — ceux-ci peuvent se trouver, même en quantité considérable, dans les dernières portions du canal digestif : spécialement dans l'iléum et dans le cæcum.

Il n'était pas besoin de réfléchir longtemps pour comprendre que cette excrétion intestinale de vibrions ne doit pas être considérée comme un fait purement accidentel ou accessoire.

Le phénomène n'avait pas, en réalité, échappé aux observateurs précédents. Mais on avait été toujours enclin à le contester ou à le négliger, notamment par l'école de Koch, sa signification pathogénique pouvant apparaître comme un argument en faveur de vieilles doctrines épidémiologiques.

Il est en effet très intéressant de connaître l'histoire rétrospective et les nombreuses contestations auxquelles a donné lieu la constatation de vibrions, dans l'intestin des cobayes inoculés par voie péritonéale.

Ce fut H. Buchner (1) qui signala, pour la première fois, le passage dans l'intestin des vibrions cholériques injectés sous la peau.

Dans un long travail expérimental exécuté à Munich, en 1885, Buchner s'était proposé de démontrer que le *Bacillus neapolitanus*, isolé alors à Naples par Emmerich et considéré par lui comme l'agent spécifique du choléra, avait des affinités intestinales très marquées qui paraissaient au contraire faire complètement défaut au bacille virgule, découvert par Koch peu de temps auparavant.

Au cours de ses recherches, à l'autopsie d'un cobaye mort à la suite d'une injection sous-cutanée de 5 cent. cubes de culture cholérique, Buchner retrouva des vibrions sur un point du contenu de l'intestin grêle (2).

La valeur de cette observation isolée fut, cependant, contestée par le travail bien connu de Wyzsokowitsch, exécuté peu après dans le laboratoire de Flügge, à Göttingue.

(1) Beiträge zur Kenntniss des Neapeler Cholerabacillus und einiger demselben nahe stehender Spaltpilze. *Archiv für Hygiene*, 1885, 3, p. 361.

(2) *Ibid.*, p. 400.

Ayant répété la même expérience (1) et ayant fait en outre une longue série d'autres expériences sur les lapins, en sacrifiant ces animaux à différentes périodes, après des injections sous-cutanées et endoveineuses de vibrions, Wyzsokowitsch avait fini par conclure qu'il n'était pas possible de constater aucun passage de ces mêmes vibrions dans le contenu intestinal.

A peu près à la même époque, d'autres expériences exécutées par D. D. Cunningham (2), aux Indes, avaient appelé l'attention sur le même sujet.

Après avoir injecté de fortes doses de vibrions dans le tissu sous-cutané de quelques cobayes, Cunningham avait vu, à l'autopsie, que ces mêmes vibrions étaient passés dans le contenu de l'intestin grêle.

Cette observation fut, elle aussi, bientôt contredite par Baumgarten (3). Celui-ci n'hésita pas à l'attribuer à une erreur de technique. Mais l'année suivante parurent quelques intéressants travaux de F. Hüppe de Wiesbaden.

Hüppe constata effectivement que les vibrions, injectés dans le péritoine des cobayes, passent dans le contenu intestinal. Dans une première publication (4) il suppose que le passage s'opère à travers d'hypothétiques stomates préexistants, mais dans les publications successives (5), quoique en opposition avec les résultats de Wyzsokowitsch, il se convertit à l'idée de la véhicularité sanguine.

Mais Hüppe n'attribue pas, lui non plus, à ce fait une importance quelconque. Il admet sans discuter, et comme bien démontré, que, chez l'homme, les vibrions arrivent à l'intestin directement par la bouche. Le but fondamental de ses expériences qui, en ce temps-là, donnèrent lieu à des discussions très vives, était tout autre. Il s'était proposé, avant tout, de démontrer que les vibrions sont des microbes anaérobies facul-

(1) *Loc. cit.*, p. 26.

(2) On the effects sometimes following injection of choleraic Comma-bacilli into the subcutaneous tissues in Guineapig. *Scientific Memoirs by Medical officers of the Army of India*. Calcutta, 1886, p. 1.

(3) Jahresbericht v. d. pathogenea Mikroorganismen, 1886, 2, p. 301.

(4) Ueber Fortschritte in der Kenntniss der Ursachen der Cholera asiatica. *Berlin. klin. Woch.*, 1887, n° 9-12.

(5) Ueber Thierversuche bei Cholera asiatica. *Berlin. klin. Woch.*, 1887, n° 22 et : Einige Bemerkungen über Thierversuche bei Cholera asiatica. *Deutsche med. Woch.*, 1887, n° 30.

tatifs. Arrivés dans l'intestin et, plus précisément dans l'intestin grêle, regardé par lui comme un *locus minoris resistentiae*, les vibrions s'y multiplieraient à foison, hors du contact de l'air, en fabriquant, à la suite d'une action vitale sur les albumines, un poison particulier analogue à celui qu'il étudia plus tard, avec Scholl (1), en cultivant en anaérobiose les vibrions cholériques dans les œufs.

Hüppe s'était proposé, en outre, de concilier l'ancienne doctrine localiste de l'école de Pettenkofer avec la nouvelle doctrine contagionniste de l'école de Koch, en admettant dans les vibrions du choléra la possibilité de se développer dans le sol et la faculté de produire des arthrospores très résistantes, capables d'infecter la bouche de l'homme, même par l'air.

Mais, dans son travail déjà plusieurs fois cité sur le poison du choléra, paru quelques années après, R. Pfeiffer contesta et tenta de détruire, point par point, toutes les conclusions de Hüppe. « Dans le contenu intestinal des cobayes — affirme-t-il — « je n'ai jamais trouvé de bactéries du choléra (2). » « Les « vibrions du choléra injectés dans le péritoine sont tués rapidement, ce qui s'explique par les énergiques propriétés « vibrionicides du sérum des différentes espèces animales (3). »

Quant aux produits toxiques obtenus par la culture anaérobie dans les œufs, Pfeiffer démontre qu'il s'agissait de poisons putrides, dus à des cultures contaminées et à la présence d'hydrogène sulfuré (4).

Gruber et Wiener (5) ont contesté, eux aussi, avec non moins d'énergie, les résultats de Hüppe. Mais, malgré tout cela, la question ne resta pas longtemps assoupie.

Cette même année, Vincenzi (6), en faisant, à Sassari, des expériences avec le même vibron de Massaua, dont Pfeiffer s'était déjà servi, signale de nouveau, mais sans lui attribuer une spéciale importance, la présence de vibrions dans l'intestin

(1) Untersuchungen über giftige Eiweisskörper bei Cholera asiatica und einigen Fäulnisprocessen. *Arch. für Hygiene*, 1892, **15**, p. 172.

(2) *Loc. cit.* (Cholera gift), p. 399.

(3) *Ibid.*, p. 400.

(4) *Loc. cit.* (Cholera ätiologie), p. 273.

(5) Ueber die intraperitoneale Cholerainfection der Meerschweine. *Arch. für Hygiene*, 1892, **11**, p. 262.

(6) Ricerche sperimentali sul cholera. *Arch. per le Scienze med.*, 1892, **16**, p. 327.

des cobayes inoculés dans le péritoine. L'année suivante, Sobernheim parvient également à la même conclusion, tout en avouant qu'il n'avait jamais réussi à trouver les bactéries du choléra dans l'épaisseur des parois intestinales (1).

Ce fut alors que Pfeiffer invita Kolle à reprendre la question.

Mais les recherches de Kolle, exécutés à l'Institut pour les maladies infectieuses de Berlin, sous le contrôle de Pfeiffer lui-même, paraissent manifestement dominées par deux préoccupations fondamentales : celle de confirmer, à tout prix, les idées de Pfeiffer et celle de combattre, de toutes les façons, les vues de Hüppe!

Kolle ne peut, en effet, contester que dans les cobayes qui meurent à la suite de l'inoculation de vibrions dans le péritoine, ces derniers se retrouvent dans l'intestin. Mais il ajoute que ce fait ne se vérifie que dans un léger pourcentage de cas et que les vibrions s'y trouvent toujours en très petite quantité (2). Il observe en outre que, en tout cas, ils ne déterminent aucun symptôme ou aucune altération pathologique de l'intestin; que leur apparition dans le canal intestinal constitue un événement secondaire qui n'a rien à faire avec le tableau morbide; que la présence de vibrions dans le canal intestinal n'est nullement nécessaire pour que se produise le *stadium algidum* de Pfeiffer; que, enfin, on ne saurait exclure les erreurs de technique et les faciles blessures (!) des parois intestinales dans l'acte même de l'injection péritonéale des vibrions!

En conclusion, Kolle insiste encore sur l'idée de Pfeiffer touchant la présence de substances vibrionocides dans le sang des cobayes (3), à cause de laquelle, même s'ils sont injectés dans la carotide à des doses plusieurs fois mortelles, les vibrions seraient rapidement tués en quelques minutes (4). C'est seulement quand la dose injectée est très forte que les vibrions pourraient atteindre même les capillaires de la muqueuse intestinale. Mais, dans ce cas, leur isolement, à l'autopsie,

(1) Experimentelle Untersuchungen über Choleragift und Cholerascchutz. *Zeitschr. für Hygiene*, 1893, **14**, p. 489.

(2) Beiträge zu den experimentellen Cholerastudien an Meerschweinchen. *Zeitschr. für Hygiene*, 1894, **16**, p. 349 et 354.

(3) *Ibid.*, p. 355.

(4) *Ibid.*, p. 356.



devrait être simplement imputé aux abrasions accidentelles de cette muqueuse, produites par l'anse de platine (1) !

Dans un travail paru peu après celui de Kolle, G. Klemperer (2) insiste également sur ces prétendues erreurs de technique. De fait, Klemperer n'a jamais réussi à trouver les microbes du choléra dans le contenu intestinal des lapins, même en tuant ces animaux au moyen d'injections endoveineuses d'abondantes cultures vibrionniennes !

Mais toutes ces objections et toutes ces dénégations de Kolle et de Klemperer sont entièrement dénuées de base.

Dans mes nombreuses expériences j'ai toujours eu soin de recueillir le contenu des différentes portions du canal digestif avec des pipettes de la manière la plus simple et la plus précise, sans provoquer d'abrasions ou de lacérations de la muqueuse.

L'excrétion intestinale des vibrions représente donc, chez les cobayes, un phénomène constant et d'une importante signification, car elle révèle ce que l'on peut, à juste titre, appeler l'*entérotropisme* des germes cholérigènes.

Il n'est pas difficile de comprendre le mécanisme de cette excrétion.

L'irruption très précoce des vibrions péritonéaux dans la circulation sanguine donne la raison de leur localisation et de leur élimination intestinale.

Le phénomène rentre donc dans une loi générale qui règle le destin de la majeure partie des microbes qui parviennent dans le sang.

Mais on ne saurait nier que, dans une certaine mesure, il puisse se produire aussi un passage direct du péritoine à l'intestin, à travers le réseau lymphatique qui met en communication ces deux cavités.

En effet, les auteurs admettent que du réseau sous-muqueux de l'intestin tirent leur origine de gros capillaires lymphatiques dont la plupart, en perforant la paroi intestinale, se jettent dans les vaisseaux lymphatiques sous-séreux. Les lymphatiques sous-séreux seraient en outre, au moyen d'autres vaisseaux

(1) *Ibid.*, p. 356.

(2) Zur Kenntniss der natürlichen Immunität gegen asiatische Cholera. *Deutsche med. Woch.*, 1894, n° 20, p. 435.

afférents, en communication avec le réseau interlaminaire d'Auerbach qui recueille la lymphe de la tunique musculaire de l'intestin et qui, à son tour, est en rapport avec le réseau sous-muqueux.

Par conséquent, un abondant réseau lymphatique rend possibles des rapports directs entre le péritoine et l'intestin.

Or le mouvement rapide de translation possédé par les vibrions (1) est certainement capable de vaincre le contre-courant lymphatique des capillaires. Cela autorise à considérer comme possible le passage direct des vibrions de la cavité péritonéale à la paroi intestinale.

Nous pouvons donc ajouter aux précédentes ces nouvelles conclusions :

1° Le sang des cobayes ne possède aucun pouvoir vibrionicide, mais représente, au contraire, un excellent milieu nutritif pour les microbes du choléra;

2° Les vibrions du choléra, injectés dans les cobayes, finissent par abandonner le même milieu sanguin, pourtant si favorable à leur développement, pour se localiser et se concentrer seulement dans les parois intestinales qui deviennent le lieu le plus favorable à leur multiplication et, en même temps, l'organe électif de leur excrétion;

3° On ne peut exclure la possibilité que, au moyen de mouvements propres, à travers le réseau lymphatique qui met en communication la sous-séreuse avec la sous-muqueuse, les vibrions puissent se transporter, même directement, de la cavité péritonéale à la paroi intestinale.

(A suivre.)

---

(1) SANARELLI, Sur la vitesse de locomotion du vibron cholérique. *Ces Annales*, 1919, p. 569.

# L'IMMUNITÉ NATURELLE ET ACQUISE

## CHEZ LA CHENILLE DE *GALLERIA MELLONELLA*

(PREMIER MÉMOIRE)

par S. METALNIKOW.

### INTRODUCTION

Malgré toute la clarté apportée dans la compréhension de la phagocytose et de l'immunité par les recherches de Metchnikoff sur les invertébrés, l'attention des médecins et des naturalistes n'a été que peu attirée sur l'immunité des animaux inférieurs.

Cependant l'étude des animaux inférieurs est souvent très efficace pour résoudre les problèmes biologiques les plus compliqués.

Les invertébrés sont-ils capables de fabriquer les anticorps? Quelle rôle jouent ces anticorps dans l'immunité naturelle et acquise? Sont-ils capables d'immunité acquise? Comment réagissent-ils contre l'introduction des différents microbes et des différentes toxines? Problèmes du plus haut intérêt pour les biologistes ainsi que pour les médecins.

Jusqu'à ces dernières années, on pensait que les invertébrés étaient très peu aptes à fabriquer les anticorps. On pensait que les anticorps peuvent exister seulement chez les animaux qui possèdent un appareil circulatoire assez compliqué pourvu d'un système capillaire sanguin.

Metchnikoff est le premier qui ait fait des expériences sur les scorpions et les insectes (*Oryctes nasicornis*) en leur injectant des toxines tétaniques. Il n'a pas réussi à obtenir des anti-toxines. Cependant il a constaté dans le sang des scorpions l'existence d'un anticorps qui neutralisait leur propre venin. En ajoutant à ce venin le sang du scorpion il a pu rendre ce mélange inoffensif pour la souris (1).

(1) *Immunité dans les maladies infectieuses*, p. 373.

Les essais de Dungen, qui tentait d'obtenir des précipitines chez un mollusque (*Eledone moschata*) en lui injectant du sang de *Maia squinado*, échouèrent complètement (1).

Mesnil ne réussit pas non plus à obtenir des hémolysines en nourrissant les actinies avec du sang coagulé (2).

Les expériences de H. Frédéricq sur les vers à soie et les mollusques donnèrent aussi des résultats négatifs et jamais il n'a pu constater l'apparition des précipitines (3).

Harold Drew échoua également dans ses tentatives pour obtenir des anticorps chez les oursins et chez les mollusques (4).

Dans mes premières recherches sur l'immunité des chenilles de *Galleria mell.* contre la tuberculose, je pensais avoir démontré que la destruction de bacilles tuberculeux avait lieu non seulement dans les phagocytes, mais aussi dans le sang des chenilles *in vitro*.

A Pétersbourg, où je fis ces recherches, j'avais une race de bacilles tuberculeux qui se bactériolysaient très facilement même *in vitro*. Mais c'était une race exceptionnelle. Toutes celles que j'ai étudiées depuis se montrèrent beaucoup plus résistantes. Ainsi nous devons admettre que la vraie cause de l'immunité des chenilles contre les bacilles tuberculeux est la phagocytose (5).

Le Dr Nedrigailoff, qui a étudié l'immunité des chenilles de *Galleria* contre différents microbes, a confirmé les résultats de mes recherches (6); il pense que la vraie cause de l'immunité chez les chenilles est la phagocytose.

Le Dr Fiessinger, qui a beaucoup expérimenté avec des chenilles de *Galleria mell.*, arrive aux mêmes conclusions. Il écrit : « Nous avons repris les expériences de Metalnikoff et apportons une entière confirmation à ses recherches quant à la précocité de la phagocytose et à la rapidité de la bactériolyse. En somme la bactériolyse intraleucocytaire se fait avec une rapidité surprenante (7). »

(1) *Centr. f. Bakt.*, 1903, 34.

(2) *Ges. Annales*, 1901, 15, p. 382.

(3) *Arch. intern. de Physiol.*, 1910, 40, p. 39.

(4) *Journ. of Hyg.*, 1911, 11.

(5) *Centr. f. Bakt.*, 41; *Arch. Sc. Biol.*, 12 et 13.

(6) *Thèse russe*, 1910, Kharkoff.

(7) *Revue de la tuberculose*, 7, p. 192.



L'inaptitude des invertébrés à produire des anticorps semble donc assez bien établie par des expériences faites sur différentes espèces. Cependant la généralisation d'une semblable affirmation nous paraît prématurée.

Nous connaissons chez les invertébrés plusieurs exemples où l'organisme, s'adaptant à des conditions particulières, est capable d'élaborer des antiferments spécifiques. Tel est le ferment anticoagulant des sangsues et des insectes piqueurs. Telle est l'antitoxine du scorpion, dont l'existence fut démontrée par Metchnikoff.

Dans les expériences de L. James et Mandoul (1), les suc de certains ténias (*T. serrata* et *T. expansa*), parasites de l'intestin, contiennent des substances bactéricides envers le bacille typhique et le vibron cholérique.

Des constatations analogues ont été faites par Cantacuzène chez le crabe (*Carcinus mænas*) parasité par la sacculine (2).

« En traitant une bouillie de sacculine par l'alcool et en reprenant après évaporation le résidu sec par une solution physiologique, on prépare l'antigène qui sert aux expériences *in vitro*; on constate alors avec la plus grande évidence que, tandis que le sérum du crabe normal ne renferme aucun ambocepteur capable de fixer sur l'antigène une alexine de cobaye, le sérum du *Carcinus* sacculiné contient une sensibilisatrice qui absorbe énergiquement cette alexine. »

Le sang d'un autre crustacé (*Eupagurus Prideauxii*) hémolyse énergiquement les globules rouges des mammifères. Cette hémolyse est précédée par une courte phase d'agglutination. Il agglutine aussi les vibrions cholériques; les bactéries du groupe *B. coli-typhique* sont immobilisées et agglutinées rapidement; mélangé au sérum de lapin ou de cheval, le sang d'*Eupagurus* y détermine un précipité. Les injections répétées d'antigène augmentent considérablement ces propriétés et leur confèrent un caractère de spécificité qu'elles ne possédaient pas chez l'animal normal.

Le sérum d'un autre crustacé (*Pagurus Bernhardus*) ne présentant aucun pouvoir hémolytique agglutine énergiquement les globules rouges de mammifères et précipite le sérum de

(1) *C. R. Acad. des Sciences*, 1907, **89**, p. 329.

(2) *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1912, **74**, p. 109.

cheval (1). Cantacuzène a obtenu les mêmes résultats chez les Tuniciers (*Phallusia manillata*, *Ascidia mentula*). Chez des Ascidies ayant reçu plusieurs injections d'un bacille du groupe du *B. coli*, le pouvoir agglutinant apparaît non pas dans le sérum, mais bien au contact immédiat de certains amibocytes (2).

Tous les essais tentés par M. Cantacuzène pour produire des anticorps chez les Annélides et les Mollusques ont échoué.

Enfin il faut noter les travaux récents de A. Paillot, qui a réussi à immuniser les chenilles d'*Agrotis* en leur inoculant une vieille culture de *Bac. melolonthæ non liquefaciens*. Vingt-quatre heures après cette inoculation vaccinale, les chenilles devinrent réfractaires à des doses indubitablement mortelles du même microbe. Il constata alors une transformation extracellulaire des microbes en granules, qui commence au bout de dix minutes et est générale au bout de cinq heures.

De cet ensemble de faits se dégage nettement la conclusion que la faculté de produire des anticorps est beaucoup plus répandue chez les animaux inférieurs qu'on ne le pensait jusqu'à présent.

Cependant nous savons encore très peu de choses sur le rôle de ces anticorps dans l'immunité. Nous en savons encore moins sur les maladies des invertébrés, sur leurs modes de défense contre les microbes les plus dangereux, sur la phagocytose, sur la bactériolyse, etc.

### Objet de recherches et méthodes.

Ce sont ces considérations qui me ramenèrent à l'étude que j'avais entreprise il y a plus de dix ans sur l'immunité des chenilles de *Galleria mellonella*. Ces chenilles sont tout particulièrement désignées pour les expériences les plus variées. Ainsi elles pullulent prodigieusement dans les conditions de vie qu'on leur fait au laboratoire; elles sont extrêmement vivaces et résistantes; de plus, elles supportent très bien les températures élevées (37°-40°), ce qui est particulièrement

(1) *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1919, p. 1087.

(2) *C. R. de la Soc. de Biol.*, 1919, p. 1019.

important dans l'étude de l'immunité à l'égard de microbes habitués à la température du corps des animaux à sang chaud. Dans toutes mes expériences je me servais toujours presque exclusivement des chenilles de *Galleria mellonella*. Je ne m'arrête pas ici à l'anatomie et la physiologie de ces intéressants insectes puisque j'ai consacré à ces questions un travail spécial (1). Les chenilles adultes âgées de trois semaines atteignent à peu près 2 centimètres de longueur et sont très commodes à manipuler. On peut très bien leur faire des injections et leur prendre du sang.

Pour les injections, j'emploie ordinairement de longues pipettes recourbées avec un bout effilé. Pour bien déterminer la quantité de liquide injecté, on fait ordinairement, le long de la pipette, des divisions de 1 centimètre qui correspondent à peu près à 1/80 cent. de cube.

En injectant les chenilles, il faut prendre garde de ne pas endommager les organes internes, surtout l'intestin, le cœur et les nerfs. C'est pourquoi il faut introduire le bout de la pipette avec beaucoup de précautions sur les côtés de la chenille, mais pas sur le dos ou l'abdomen.

Les chenilles injectées sont placées dans de petits bocaux. Pour retirer de petites quantités de sang, on se sert de tubes capillaires effilés qu'on introduit dans le corps de la chenille infectée. Pour prendre le sang en grande quantité, il faut préalablement désinfecter la chenille en la lavant dans un liquide antiseptique. Je me sers ordinairement de la solution d'acide phénique (2-3 p. 100) où je baigne la chenille pendant 5-10 minutes. En sortant de la solution phéniquée, les chenilles sont lavées dans l'eau oxygénée et dans l'eau distillée.

En coupant une des pattes de la chenille et en la pressant légèrement, on peut en retirer quelques gouttes de sang, qu'on recueille dans un tube stérilisé. Le sang de chenille est un liquide jaune, transparent, qui ne se coagule pas et ne donne pas de sérum comme le sang des animaux supérieurs.

La coagulation se fait seulement à la surface exposée à l'oxygène de l'air ; il s'y forme une pellicule épaisse qui devient, en s'oxygénant peu à peu, brun-noir. Sous cette pellicule, le sang

(1) *Arch. Zool. Exper.*, 38.

reste liquide et transparent pendant très longtemps. C'est ce sang qu'on emploie pour les expériences.

Chose curieuse ! Plus ce sang reste longtemps en contact avec l'oxygène, plus il est toxique pour les chenilles. Injecté en quantité très petite, il provoque chez les chenilles un évanouissement qui dure souvent très longtemps. La chenille devient noire et meurt en quelques jours. Cependant la chenille supporte impunément et en grande quantité le sang et le sérum des autres animaux.

### Immunité des chenilles envers les microbes et les toxines.

En premier lieu je me suis posé la question de savoir comment se comportent les chenilles envers les microbes les plus variés, qui provoquent différentes maladies chez l'homme et chez d'autres animaux.

Dans ce but, je fis un grand nombre d'expériences avec des microbes pathogènes tout aussi bien qu'avec des microbes saprophytes. J'essayais chaque espèce de microbe en préparant avec eux deux émulsions, dont l'une plus concentrée que l'autre.

Les expériences étaient faites de la manière suivante : une culture de 24-48 heures sur gélose servait à préparer une émulsion épaisse. Pour préparer une émulsion moins dense, on prélevait une ou deux anses d'émulsion épaisse et on y ajoutait un demi-cent. cube d'eau physiologique. Ces émulsions étaient introduites dans la cavité du corps de la chenille à l'aide d'un tube effilé. Avec une certaine habitude on introduit une quantité de liquide de  $1/40$  ou de  $1/80$  de cent. cube. Les chenilles ainsi inoculées étaient placées à l'étuve à la température de  $37^{\circ}$ . A des intervalles de temps précis, on prélevait du sang avec un tube capillaire effilé. Cela permettait de suivre pas à pas le sort des microbes dans l'organisme de la chenille. Pour étudier les changements qui se passent à l'intérieur de l'organisme, il est indispensable de faire des coupes. Les chenilles sont fixées dans une solution bouillante de sublimé corrosif avec acide acétique (3 p. 100) et incluses dans la paraffine d'après les méthodes ordinaires.

Les résultats des expériences sont exposés dans le tableau I.



TABLEAU I.

Noms de microbes	EFFET D'UNE DOSE	
	forte	faible
B. tuberculeux humain. . . . .	0	0
B. tuberculeux bovin. . . . .	0	0
B. tuberculeux aviaire. . . . .	0	0
B. tuberculeux pisciaire. . . . .	0	0
Paratuberc. Rabinovitch. . . . .	0	0
— Crollin. . . . .	0	0
— Grassenberger. . . . .	0	0
B. diphtérique. . . . .	0	0
Streptocoque. . . . .	0	0
B. sporogène. . . . .	0	0
Tétanos. . . . .	0	0
Sarcine. . . . .	0	0
Pseudo-tuberculeux. . . . .	0	0
Péritumonie. . . . .	0	0
Staphylocoque blanc. . . . .	0	0
Rouget. . . . .	0	0
Peste (peu virulent). . . . .	0	0
Peste (très virulent). . . . .	+	0
Staphylocoque doré. . . . .	+	0
Charbon. . . . .	+	0
Perfringens. . . . .	+	0
Vibron septique. . . . .	+	0
OEdème. . . . .	+	0
Gonocoque. . . . .	+	0
Choléra des poules. . . . .	+	0
Choléra asiatique. . . . .	+	0
B. dysentérique (Shiga). . . . .	+	0
Typhique. . . . .	+	0
Paratyphique A. . . . .	+	0
Paratyphique B. . . . .	+	0
B. coli commun. . . . .	+	+
Vibron Metchnikovi. . . . .	+	+
B. pyocyanique. . . . .	+	+
B. subtilis. . . . .	+	+
Anthracoïdes. . . . .	+	+
Proteus N 19 Metz. . . . .	+	+
Proteus N 19 Syrie. . . . .	+	+

Groupe A.

Groupe B.

Groupe C.

D'après ce tableau on voit que tous les microbes sur lesquels j'ai expérimentés peuvent être répartis en trois groupes.

Le premier groupe A contient les microbes contre lesquels les chenilles possèdent une immunité complète. On peut inoculer à ces chenilles non seulement 1/80 de cent. cube d'émul-

sion microbienne, mais même jusqu'à plus de 1/20 de cent. cube, c'est-à-dire une quantité à peu près égale à la quantité totale du sang de la chenille; celle-ci non seulement reste vivante et se transforme normalement en chrysalide et en papillon, mais elle détruit les microbes avec une rapidité surprenante. Cette destruction des microbes n'est pas due à ce qu'ils ne peuvent pas vivre dans les humeurs de la chenille, où ils seraient dissous, mais elle est due à une réaction active des cellules, c'est-à-dire à la phagocytose.

Généralement tous les processus morbides s'accomplissent très rapidement en 24-48 heures, surtout à la température de 37°. Ils sont moins rapides à la température du laboratoire. Si la chenille n'est pas capable de venir à bout en 24 heures des microbes injectés, elle succombe très vite à la septicémie ou à l'intoxication. Si, par contre, elle prend le dessus, la guérison se fait aussi très rapidement.

*Le second groupe B* contient les microbes contre lesquels les chenilles ont une immunité incomplète. Elles ne résistent pas à de fortes doses; elles succombent dans les premières 24-48 heures. Par contre, elles supportent des doses plus faibles et guérissent très rapidement.

*Le troisième groupe C* contient des microbes auxquels les chenilles sont très sensibles et vis-à-vis desquels elles ne manifestent aucune immunité. Inoculés même à très petites doses, ils provoquent toujours une infection mortelle. La maladie se développe dès les premières heures et la chenille succombe généralement le lendemain. En comparant les trois groupes de microbes, on est avant tout frappé par un fait étrange et même paradoxal. Les chenilles sont réfractaires aux microbes pathogènes les plus dangereux, qui provoquent toujours une infection mortelle chez les animaux supérieurs. D'autre part, les chenilles sont très sensibles aux microbes saprophytes ou peu pathogènes que j'ai étudiés.

Quelle est l'explication de ce fait étrange?

Cela dépendrait-il de ce que les chenilles sont insensibles aux toxines des microbes pathogènes et qu'elles sont sensibles aux sécrétions des microbes saprophytes?

Pour résoudre cette question, j'ai entrepris toute une série d'expériences avec des toxines solubles et des endotoxines.

En premier lieu, j'ai étudié les toxines solubles, comme la toxine tétanique, diphtérique, etc. Injectées même en doses très grandes, elles ne provoquaient aucun trouble chez les chenilles.

EXPÉRIENCE n° 20. — 5 chenilles reçurent dans la cavité du corps 1/80 de cent. cube de toxine tétanique. Vingt-quatre, quarante-huit heures plus tard, toutes étaient vivantes et se transformaient normalement en chrysalides et papillons.

EXPÉRIENCE n° 21. — 5 chenilles reçurent 1/80 de cent. cube de toxine diphtérique. Vingt-quatre, quarante-huit heures plus tard, toutes étaient vivantes.

EXPÉRIENCE n° 25. — 5 chenilles reçurent 1/80 de cent. cube de tuberculine. Vingt-quatre, quarante-huit heures plus tard, toutes étaient vivantes.

EXPÉRIENCE n° 30. — 5 chenilles reçurent 1/80 de cent. cube d'endotoxine de *Proteus*. Quinze heures après l'injection, toutes les chenilles étaient mortes.

Les mêmes expériences étaient faites avec les cultures filtrées de *Proteus*, de *Subtilis*, d'*Anthracoïdes*, de bacilles dysentériques, typhiques, etc., c'est-à-dire avec les microbes les plus pathogènes pour les chenilles.

Les filtrats de ces cultures étaient injectés à des doses très grandes sans provoquer aucun malaise chez les chenilles.

On peut dire que nos chenilles sont complètement insensibles aux toxines solubles.

La chose se passe autrement si on leur injecte les endotoxines.

Comme on sait, il y a une grande différence entre les microbes toxigènes tel que le bacille diphtérique et les microbes à endotoxine, tel que le vibrion cholérique, le bacille typhique, etc. Ce sont surtout ces microbes à endotoxine qui sont très toxiques pour les chenilles.

Si nous prenons ces deux microbes en culture, en bouillon, si nous centrifugeons, puis si nous examinons séparément la partie liquide et le dépôt, nous constatons ceci : dans la culture diphtérique, la partie liquide est toxique, tandis que le dépôt l'est à peine ; c'est l'inverse pour la culture cholérique : la partie liquide est très peu active, tandis que le dépôt, même chauffé à 55°-60°, est très toxique.

Nous avons préparé les endotoxines de la façon suivante :

La culture de 3-5 jours en bouillon est centrifugée, le dépôt est chauffé à 58° pendant une heure.

EXPÉRIENCE n° 87. — 5 chenilles reçurent 1/80 de cent. cube de bacilles typhiques. Vingt heures après l'injection, toutes les chenilles étaient mortes.

EXPÉRIENCE n° 89. — 5 chenilles reçurent 1/80 de cent. cube d'endotoxine de bacille paratyphique A. Vingt heures après l'injection, toutes les chenilles étaient mortes.

EXPÉRIENCE n° 90. — 5 chenilles reçurent 1/80 de cent. cube d'endotoxine du bacille coli. Vingt heures après l'injection, toutes les chenilles étaient mortes.

EXPÉRIENCE n° 91. — 5 chenilles reçurent 1/80 de cent. cube d'endotoxine du bacille coli chauffé à 100°. Vingt heures après l'injection, toutes les chenilles étaient mortes.

EXPÉRIENCE n° 92. — 5 chenilles reçurent 1/200 de cent. cube d'endotoxine du bacille coli. Vingt heures après l'injection, toutes les chenilles étaient mortes.

J'ai fait les mêmes expériences avec les endotoxines du bacille pyocyanique, prodigiosus, charbon, etc., avec les mêmes résultats; cela prouve que les microbes pathogènes pour les chenilles agissent principalement par leurs endotoxines, qui sont toujours virulentes pour les chenilles.

En examinant le sang des chenilles qui ont reçu les endotoxines, on peut toujours constater la diminution rapide des globules blancs. Ceux qui restent sont souvent gonflés et déformés.

J'ai essayé aussi quelques autres substances toxiques.

Le venin de serpent (cobra) est très toxique pour les chenilles. Injecté même à dose très petite, il tue la chenille instantanément.

La bile est aussi très toxique. 1/160 de cent. cube de bile de bœuf tue la chenille en quelques secondes.

Le sang des autres animaux et d'autres insectes, injecté en grande quantité, n'agit pas sur les chenilles. Parfois j'injectais aux chenilles une telle quantité de sang de mouton ou de cobaye qu'elles devenaient rouges, mais cela ne les empêchait pas de vivre et de se transformer normalement en chrysalides et en papillons.

Elles sont aussi très peu sensibles aux différentes couleurs (1) que je leur injectais en quantité colossale.

Toutes nos expériences démontrent que les chenilles sont en effet douées d'une vitalité et d'une résistance extraordinaires contre les microbes et les substances toxiques. On peut même

(1) Voir mon travail des *Arch. Zool. Expér.*, 1908.



dire que leur résistance, leur immunité contre les microbes les plus dangereux est beaucoup plus forte que chez les animaux supérieurs. Leurs moyens de défense contre ces microbes sont beaucoup plus efficaces.

D'après le tableau I ci-dessus, nous voyons que le groupe A des microbes est complètement inoffensif pour les chenilles. Ce groupe contient les microbes les plus redoutables et les plus résistants.

Le second groupe B, qui contient aussi des microbes très dangereux, est aussi peu virulent pour les chenilles.

Comme nous l'avons vu, les chenilles résistent très bien aux faibles doses des microbes du groupe B. Mais ce que nous appelons une faible dose est en réalité une dose colossale eu égard aux petites dimensions de la chenille.

Nous devons noter encore un fait intéressant. Parmi tous les microbes avec lesquels nous avons expérimenté (plus de 40 espèces), c'est le bacille tuberculeux qui est le moins virulent pour les chenilles. Les bacilles tuberculeux, si bien protégés par leurs capsules cireuses, les bacilles tuberculeux, si résistants et qui restent vivants pendant des années dans l'organisme d'un animal supérieur et dans celui de l'homme, sont complètement inoffensifs pour les chenilles. On peut leur injecter des quantités formidables de bacilles tuberculeux les plus virulents sans produire aucun trouble. Ce qui est surtout important, c'est que tous ces bacilles tuberculeux sont complètement digérés et détruits en deux ou trois jours.

Le microbe le plus virulent pour la chenille c'est le *Proteus* qui la tue à coup sûr, même en quantité très minime. Pour contaminer la chenille, il faut absolument lui injecter le microbe dans la cavité du corps. Toutes mes tentatives de contaminer la chenille en lui donnant les microbes *per os*, ou bien en les introduisant dans les téguments par friction, ont échoué. J'ai essayé aussi bien des fois de mettre les chenilles malades et mortes à côté de chenilles bien portantes et jamais je n'ai réussi à leur communiquer la maladie.

Il y a plus de dix ans que j'ai de nombreuses cultures de chenilles dans mon laboratoire, des milliers de chenilles sont passées entre mes mains et jamais je n'ai rencontré d'épidémies. Parfois je trouvais dans mes cultures des chenilles malades et

mortes. J'ai isolé trois espèces de microbes qui provoquent chez elles ces maladies naturelles, mais jamais je n'ai pu produire une épidémie.

Tous ces faits prouvent effectivement que nos chenilles possèdent des moyens extraordinaires de défense contre les microbes.

Il est d'autant plus intéressant d'élucider les causes qui rendent les chenilles aussi résistantes envers les microbes, que cela peut avoir un intérêt non seulement théorique, mais aussi pratique.

### La Tuberculose.

Je commence mes études sur l'immunité des chenilles par la tuberculose, car ce microbe présente le cas le plus intéressant et le plus démonstratif. Comme je l'ai démontré, parmi tous les microbes que j'ai expérimentés, c'est le bacille tuberculeux qui est le moins virulent pour la chenille. C'est dans l'immunité envers la tuberculose que la chenille révèle tous ses moyens de défense antimicrobiens.

Mais quelle est la cause de cette immunité extraordinaire? Par quels moyens parvient-elle à se débarrasser de bacilles tellement résistants et si dangereux pour les autres animaux?

A-t-elle quelque chose de spécifique dans son organisation qui lui facilite cette lutte contre les bacilles tuberculeux?

Ces problèmes sont du plus haut intérêt.

Les nombreuses expériences que j'ai faites avec différentes espèces de bacilles tuberculeux me persuadèrent que les chenilles possèdent une immunité complète envers toutes les espèces et races de bacilles tuberculeux, ainsi qu'envers les bacilles paratuberculeux.

J'ai essayé des bacilles jeunes et des bacilles âgés, des bacilles de différentes provenances et à différentes doses. Le résultat a été toujours le même, à savoir : la destruction des bacilles tuberculeux dans les chenilles contaminées et la guérison de celles-ci. Les chenilles infectées par la tuberculose se transformaient normalement en chrysalides et en papillons.

Voici quelques expériences :

EXPÉRIENCE n° 20. — 10 chenilles reçurent dans la cavité générale 1/80 de cent. cube d'émulsion très épaisse de bacilles tuberculeux humains. Après sept

jours, toutes les chenilles se transformaient normalement en chrysalides et ensuite en papillons.

EXPÉRIENCE n° 10. — 15 chenilles reçurent 1/80 de cent. cube de bacilles tuberculeux bovins. Après douze jours, toutes les chenilles se transformaient en chrysalides et en papillons.

EXPÉRIENCE n° 15. — 15 chenilles reçurent 1/80 de cent. cube de bacilles tuberculeux aviaires. Après onze jours, toutes les chenilles se transformaient en chrysalides et en papillons.

EXPÉRIENCE n° 18. — 10 chenilles reçurent 1/80 de cent. cube de bacilles tuberculeux pisciaires. Après huit jours, toutes les chenilles se transformaient en chrysalides et en papillons.

Toutes ces expériences étaient faites à la température de 37°.

En examinant le sang de la chenille, quinze, vingt, trente, soixante minutes après l'injection, on peut constater toujours

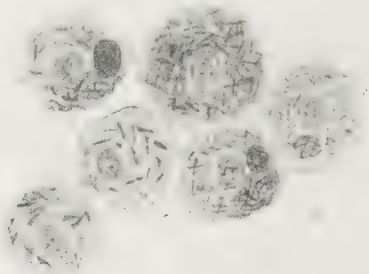


FIG. 1. — Groupes de phagocytes trois heures après l'injection de bacilles tuberculeux.

une phagocytose très intense. Trente à soixante minutes après l'injection presque tous les bacilles tuberculeux sont déjà ingérés par les phagocytes. Si l'émulsion des bacilles tuberculeux est très homogène, les phagocytes englobent une telle quantité de bacilles qu'ils en sont bourrés et ont l'apparence de petits sacs remplis de bacilles tuberculeux (fig. 1).

Si la quantité de bacilles tuberculeux injectée n'était pas trop grande, ils étaient phagocytés et digérés en cinq à huit heures. Mais ce n'est pas tout; on voit bien sur les coupes qu'à côté de la phagocytose, il y a encore la formation (surtout autour de grumeaux de bacilles tuberculeux) de cellules géantes et de capsules. Cette formation des cellules géantes commence deux à trois heures après l'injection des bacilles tuberculeux. En faisant les coupes des chenilles deux, trois, quatre, cinq heures après l'injection de bacilles tuberculeux, on peut poursuivre

tous les stades successifs de cette formation de cellules géantes et des capsules.

Les phagocytes, en s'accolant autour des grumeaux de bacilles tuberculeux, forment un plasmode, une cellule géante. Avec le temps ces plasmodes dégénèrent graduellement.

Des leucocytes nouveaux affluent continuellement de la périphérie, se disposent au pourtour et constituent une capsule composée de tissu conjonctif (voir les figures 2, 3, 4).

Au centre de ces capsules se trouvent toujours des masses de

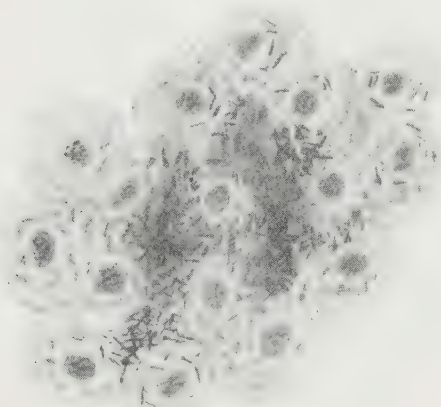


Fig. 2. — Groupes de phagocytes autour des masses de bacilles tuberculeux.

bacilles tuberculeux déjà digérés et transformés en un pigment brun-noir. En examinant attentivement ce pigment, on trouve tous les stades de la destruction et de la digestion des bacilles tuberculeux.

La formation des plasmodes sert évidemment à intensifier la digestion. Dans l'absorption des aliments par les phagocytes, seules de petites doses de substances peuvent être digérées. Dans les cas où de grandes quantités doivent être digérées à la fois, cela s'effectue par l'action combinée de plusieurs cellules. Il se forme alors des agglomérations et toutes les substances à digérer subissent à la fois l'action d'une grande quantité de liquide digestif.

Certainement le même résultat pourrait être obtenu par la



phagolyse (ce qui a souvent lieu chez les mammifères). Ce moyen est moins efficace, attendu que les ferments digestifs devenus libres se dissolvent dans la quantité totale du plasma sanguin. Voilà pourquoi il est plus avantageux de provoquer dans un seul endroit la fixation de tous les éléments à dissoudre. Ce but est parfaitement atteint par la formation d'amas de leucocytes autour des masses de microbes fixés et isolés des

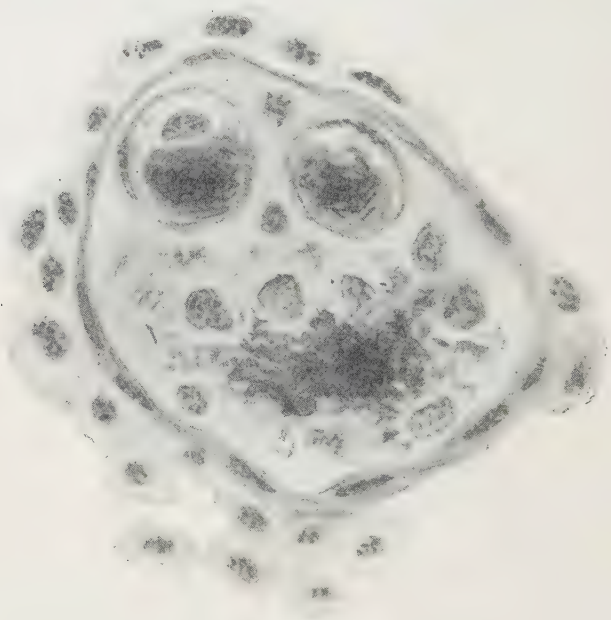


FIG. 3. — Formation de la capsule autour des agglomérations de phagocytes vingt heures après l'injection de bacilles tuberculeux.

organes sains par une capsule. C'est peut-être grâce à ces capsules que les chenilles parviennent à lutter si bien et si rapidement contre beaucoup de microbes, même les plus résistants.

La rapidité avec laquelle se déroule ce processus de formation des capsules est étonnante, deux à trois heures seulement après l'introduction des microbes s'établit l'agglomération des phagocytes et la formation des capsules. Le lendemain il y a déjà des centaines de capsules formées. On peut dire que la plus grande partie des microbes injectés est digérée non pas dans

les phagocytes isolés, mais dans ces capsules. Proportionnellement à la quantité des microbes injectés, il se forme une quantité plus ou moins grande de capsules.

Toutes les capsules contiennent à l'intérieur un pigment brun-noir, ce qui les rend très visibles dans la cavité générale de l'insecte, même à l'œil nu ou encore mieux à la loupe (voir fig. 5). Elles se présentent comme des taches noires dis-

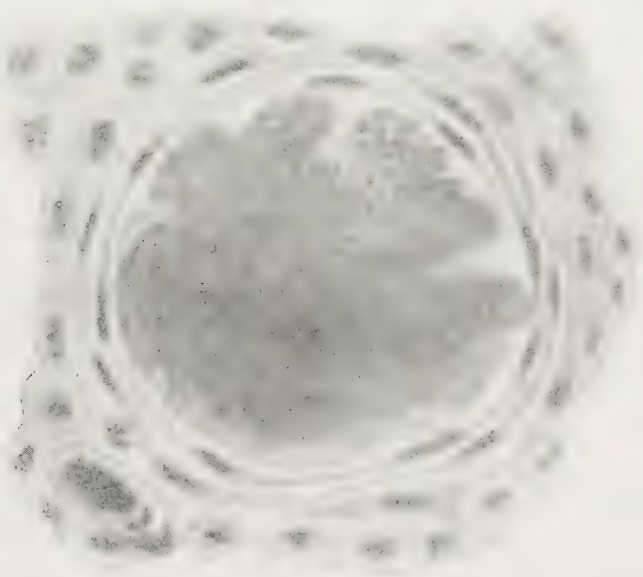


Fig. 4. — Capsule autour des bacilles tuberculeux digérés et transformés en pigment brun-noir trois jours après l'injection des bacilles tuberculeux.

persées sur les organes internes de la chenille. La plus grande partie des capsules est logée à la face dorsale, dans la région du cœur, surtout dans le bout postérieur de la chenille; souvent, dans cet endroit, la quantité de capsules est si grande que les derniers segments de la chenille se présentent colorés en brun-noir.

Cette accumulation des capsules dans le bout postérieur s'explique très facilement par le fait que le sang circule dans la cavité générale de la chenille de la tête vers la queue. C'est ainsi que toutes les agglomérations de microbes et de phagocytes sont entraînées passivement vers le bout postérieur.

Après cet exposé relatif aux formations et au rôle des capsules, nous devons nous demander : sont-elles de véritables tubercules ?

Comme on sait, le tubercule est caractérisé histologiquement par une cellule géante qui est entourée d'une couronne de cellules épithélioïdes et de cellules embryonnaires.

« Le centre de ces formations, le protoplasma, puis les noyaux des cellules géantes se détruisent; on n'en distingue bientôt plus que les résidus parmi lesquels les bacilles sont plus ou moins nombreux, irrégulièrement disséminés surtout à la périphérie, au dedans de la zone des cellules épithéliales. »

« Lorsque la caséification s'étend, les bacilles colorables diminuent de nombre et finissent par disparaître tout à fait en apparence. En cet état de tubercule caséux, la lésion peut encore régresser. Alors les cellules embryonnaires qui entourent la petite masse s'organisent en tissu fibreux, formant une paroi dense qui s'épaissit graduellement jusque vers le centre, où l'on ne trouve finalement que des débris de leucocytes (1). »

D'après cette brève description du vrai tubercule des mammifères, nous devons convenir que les capsules des chenilles sont des formations tout à fait analogues. La formation de la cellule géante, sa caséification, les cellules embryonnaires s'organisant en tissu fibreux, tout se passe comme chez les mammifères. La différence est dans la vitesse avec laquelle se produit l'évolution du tubercule. Tandis que chez les mammifères c'est un processus lent, chronique, qui dure souvent des mois et des années, chez la chenille tout se passe très rapidement, en quelques heures.

Quel est le sort ultérieur des tubercules dans le corps de la chenille ?

L'examen des coupes de chrysalides et de papillons démontre que toutes les capsules restent intactes chez les chrysalides comme chez les papillons. C'est d'autant plus étonnant que presque tous les organes internes larvaires de la chenille pendant la métamorphose sont détruits et transformés en organes et en tissus nouveaux.

En plaçant les chenilles infectées par les bacilles tuberculeux

(1. A. CALVETTE. *L'infection bacillaire et la tuberculose*, p. 93.

à des températures plus basses ( $10^{\circ}$ - $12^{\circ}$ ), on peut ralentir le développement.

C'est ainsi que je pus avoir des chenilles tuberculeuses qui ont vécu pendant vingt à trente jours après l'infection.

Les recherches microscopiques démontrèrent que toutes

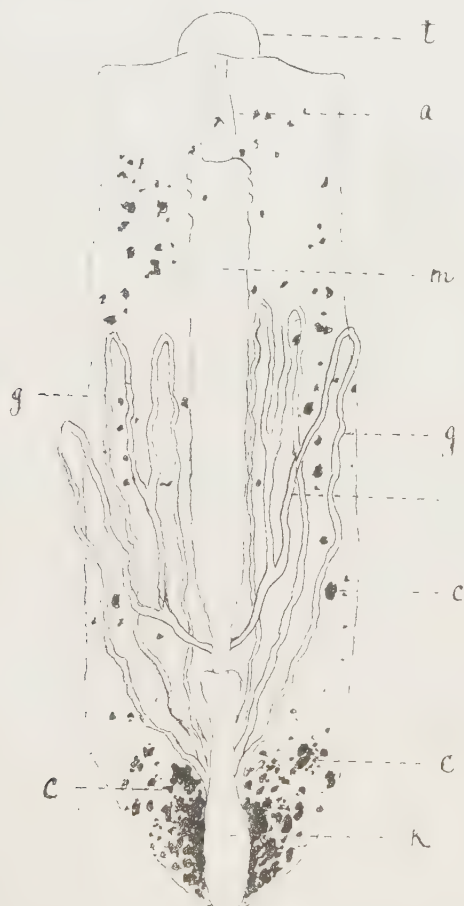


FIG. 5. — Cavité interne de la chenille injectée de bacilles tuberculeux : *t*, tête; *a*, intestin antérieur; *m*, intestin moyen; *k*, intestin terminal; *g*, tubes de Malpighi; *c*, capsules remplies de bacilles tuberculeux transformés en un pigment brun noir.

les capsules étaient intactes. Seulement leur contenu — le pigment brun-noir — était devenu plus homogène et liquide. Une partie de ce pigment liquéfiée était passée dans le sang,



d'où elle était éliminée par les cellules péricardiales. C'est une nouvelle preuve que ces cellules jouent un rôle excréteur, car elles éliminent de l'organisme les produits des déchets de la cellule.

Qu'est-ce que ce pigment brun-noir? Présente-t-il quelque chose de spécifique pour les bacilles tuberculeux digérés?

Comme je l'ai déjà démontré dans mon premier mémoire sur l'anatomie et sur la physiologie des chenilles (1), la production de ce pigment se manifeste au cours de la phagocytose de divers microbes (*Subtilis*, charbon, etc.). On sait que le sang des chenilles renferme un ferment spécifique, qui produit sous l'influence de l'oxygène de l'air un pigment brun, dont la teinte s'assombrit assez rapidement. La formation de ce pigment à l'intérieur des phagocytes et des capsules démontre que la digestion des microbes est accompagnée d'un processus d'oxydation intense.

La destruction des bacilles tuberculeux dans le sang des chenilles a-t-elle lieu aussi en dehors des cellules?

Toutes mes recherches faites dernièrement pour élucider ce fait, que j'avais soutenu antérieurement, me donnèrent la conviction qu'il n'y a pas de bactériolyse.

Tous les bacilles tuberculeux sont digérés soit à l'intérieur de phagocytes isolés, soit à l'intérieur des capsules.

S'il en est ainsi pour les chenilles, que se passe-t-il chez les chrysalides et chez les papillons? Sont-ils aussi réfractaires aux bacilles tuberculeux? Ce serait surtout intéressant d'étudier l'immunité pendant la métamorphose, durant laquelle les phagocytes jouent, comme on le sait, un rôle spécial dans la destruction des vieux organes larvaires. Les phagocytes sont-ils capables de défendre l'organisme à ce moment critique de la vie de l'insecte?

Pour résoudre cette question, j'injectais les bacilles tuberculeux à la chenille au moment précis de sa transformation en chrysalide. L'étude du sang et des coupes des chrysalides fixées me donna la conviction que les chrysalides sont aussi réfractaires aux bacilles tuberculeux que les chenilles. Une heure après l'injection on observe déjà une phagocytose

(1) *Arch. Zool. Expér.*, 38.

intense. Deux heures plus tard, on ne trouve plus de bacilles tuberculeux libres. Tous les bacilles sont englobés soit par les phagocytes isolés, soit par leurs agglomérations; de dix-huit à vingt heures après l'injection des bacilles tuberculeux, j'ai trouvé dans la cavité générale des chrysalides contaminées des capsules typiques déjà bien formées.

À l'intérieur des capsules, il y avait le pigment brun à côté des bacilles bien colorables par la fuchsine de Ziehl. Il me semble que cette destruction des bacilles tuberculeux se passe ici plus lentement que chez les chenilles.

Toutes les chrysalides injectées par les bacilles tuberculeux se transformèrent en papillons.

J'ai fait les mêmes expériences avec les papillons en leur injectant de l'émulsion de bacilles tuberculeux. Le lendemain, j'ai trouvé tous les bacilles tuberculeux à l'intérieur de petites capsules. Deux jours après l'injection, j'ai constaté la formation de pigment brun-noir et la destruction des bacilles à l'intérieur des capsules.

Ici comme chez les chenilles, nous avons les mêmes phénomènes : phagocytose, formation des capsules et digestion des bacilles tuberculeux. En nous basant sur ces faits, nous pouvons dire que la mite des abeilles est douée d'immunité naturelle contre la tuberculose à tous les stades de sa vie aussi bien qu'au moment de sa métamorphose.

Tout récemment, le Dr Fiessinger, qui a travaillé aussi avec les chenilles, dans une communication faite à la Société de Biologie, confirme mes constatations sur la destruction de bacilles tuberculeux.

« Les bacilles sont déjà phagocytés par les leucocytes une demi-heure après l'ingestion. Vers la troisième heure les bacilles phagocytés s'amassent en vacuoles brunâtres, leur acidophilie disparaît. Il se produit une véritable bactériolyse *in vivo*. La mite continue son cycle normal et forme une chrysalide normale. » L'auteur se demande dans quelle mesure la disparition des bacilles tuberculeux correspond à une destruction véritable de ces bacilles.

Pour résoudre cette question, il injecte au cobaye le contenu des chevilles inoculées avec les bacilles tuberculeux, deux, cinq et huit heures auparavant.

Tous les cobayes injectés avec les mites inoculées par les bacilles tuberculeux deviennent tuberculeux et succombent. « Or, de cinq à huit heures, il est exceptionnel de voir dans le corps de la mite le moindre vestige des bacilles tuberculeux injectés. Ils ne sont plus retrouvés peut-être parce qu'ils ont perdu leur acido-résistance, mais ils ne sont pas totalement détruits, du moins pendant les premières heures. »

Les expériences du D<sup>r</sup> Fiessinger prouvent seulement qu'en huit heures les bacilles tuberculeux ne sont pas complètement digérés dans le corps des chenilles, quoiqu'ils aient disparu du sang des chenilles.

Comme nous l'avons démontré, la plus grande partie des bacilles injectés est digérée, non dans le sang, mais dans les capsules où cette digestion se passe plus lentement. Même quelques jours après l'injection, on peut trouver des bacilles tuberculeux colorables par la méthode de Ziehl à côté de grandes masses déjà digérées et transformées en pigment. Tout dépend de la quantité et surtout de la qualité des émulsions des bacilles tuberculeux.

Si l'émulsion n'est pas assez homogène, si elle contient de gros grumeaux et des masses compactes de bacilles tuberculeux, la digestion se fait beaucoup plus lentement. C'est pourquoi il faut prendre soin de préparer des émulsions bien fines et homogènes.

EXPÉRIENCE n° 36. — 20 chenilles reçurent 1/80 de cent. cube de bacilles tuberculeux très virulents. Après cinq jours le contenu de ces chenilles est injecté à trois cobayes, un cobaye est mort tuberculeux trois mois après l'inoculation. Deux autres restèrent vivants et bien portants même dix mois après l'inoculation.

La destruction des bacilles tuberculeux dans le sang et dans les capsules est tellement démonstrative et évidente que nous pouvons affirmer que les chenilles possèdent une immunité extraordinaire envers la tuberculose et que cette immunité est due aux ferments digestifs inclus dans les corps des phagocytes. Tous mes efforts pour isoler ces ferments et les mettre en pratique comme remède contre la tuberculose sont jusqu'ici restés sans résultats.

D'après le tableau I on voit que les bacilles tuberculeux



ne sont pas les seuls microbes envers lesquels les chenilles sont complètement réfractaires. Les bacilles diphtériques tétanique, le streptocoque, les trypanosomes, etc., sont aussi inoffensifs pour les chenilles, même injectés en très grande quantité.

L'étude de l'immunité dans toutes ces maladies m'a démontré que les chenilles luttent contre tous ces microbes par deux moyens : par la phagocytose et la formation de capsules. Jamais je ne pus constater dans le sang des chenilles ni agglutinines, ni bactériolysines, ni antitoxines, etc.

C'est pourquoi nous pouvons affirmer que l'immunité naturelle des chenilles envers tous les microbes que j'ai étudiés est une immunité cellulaire.

*Le Gérant : G. MASSON.*

